



Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

Delegatura de propiedad Industrial

División de Nuevas Creaciones

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 10-117825-A-00000-0000

Fecha: 2013-03-05 17:31:29

Dep. 2020 DIR.NUEVASCR

Tra. 11 PATENTEIYII

Eve: 378 FASENACIONALI

Act. 411 PRESENTACION

Folios: 223

SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION

21. EXPEDIENTE No.

10-117825A

54. TITULO

ANTICUERPOS MONOCLONALES CONTRA
LA PROTEINA RGM A Y SUS USOS

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL

C07K 16/22, A61K 39/395

71. SOLICITANTE

ABBVIE, INC

DOMICILIO

1 North Waukegan Road, North Chicago,
Illinois 60064. Estados Unidos de América.

74. APODERADO

ALICIA LLOREDA RICAURTE

22. BOGOTÁ, D. C.,

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 10-117825-00000-0000
Fecha: 2010-09-23 13:26:20 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act 411 PRESENTACION Folios: 268

radicación

FORMULARIO UNICO D

ENTRADA EN

SOLIK

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 10-117825-A-00000-0000
Fecha: 2013-03-05 17:31:29 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act 411 PRESENTACION Folios: 223

1

☒ Patente de Invención.

☐ Patente de Modelo de Utilidad.

☒ Capítulo I

☐ Capítulo II

2

SOLICITANTE (71)

Nombre: 1. ABBOTT GMBH & CO. KG y
2. ABBOTT LABORATORIES

Dirección: 1. Max-Plack-Ring 2
65205 Weisbaden
ALEMANIA y
2. 100 Abbott Park Road
Abbott Park, Illinois 60064
ESTADOS UNIDOS DE AMERICA

Domicilio: 1. Weisbaden - ALEMANIA y
2. Abbott Park, Illinois - ESTADOS
UNIDOS DE AMERICA

Lugar de Constitución: ALEMANIA y
ESTADOS UNIDOS DE AMERICA

Teléfono: Fax:
E-mail:

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☐ NIT ☐

C.E. ☐ Otro ☐

Número Cual

3

REPRESENTANTE
O APODERADO

Nombre: MARGARITA CASTELLANOS A.

Dirección: CALLE 94A No. 7A-09

Teléfono: 610 7420 Fax: 610 0706

E-mail: info@castellanosyco.com

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☒ NIT ☐

C.E. ☐ Otro ☐
Cual

Número 39'779.654 TPA 70.819

4

INVENTOR (ES) (72)

VER ANEXO # 1

5

PCT (86)

Solicitud Internacional No. PCT/EP2009/001437

Fecha 27/02/2009

Publicación Internacional No. WO 2009/106356 A1

Fecha 03/09/2009

6

Título (54)

ANTICUERPOS MONOCLONALES CONTRA LA PROTEINA RGM A Y SUS USOS

(9010 343)

7

Clasificación Internacional (51)

C07K 16/22, A61K 39/395

8

Prioridad

(33) País de Origen

(32) Fecha

(31) Número de Solicitud

SI ☒ NO ☐

US

29/02/2008

61/032,707

US

21/08/2008

61/090,743

9

Comprobantes de pago Nos.

10-78,895 y 10-78,898

Fecha Septiembre 22 de 2010

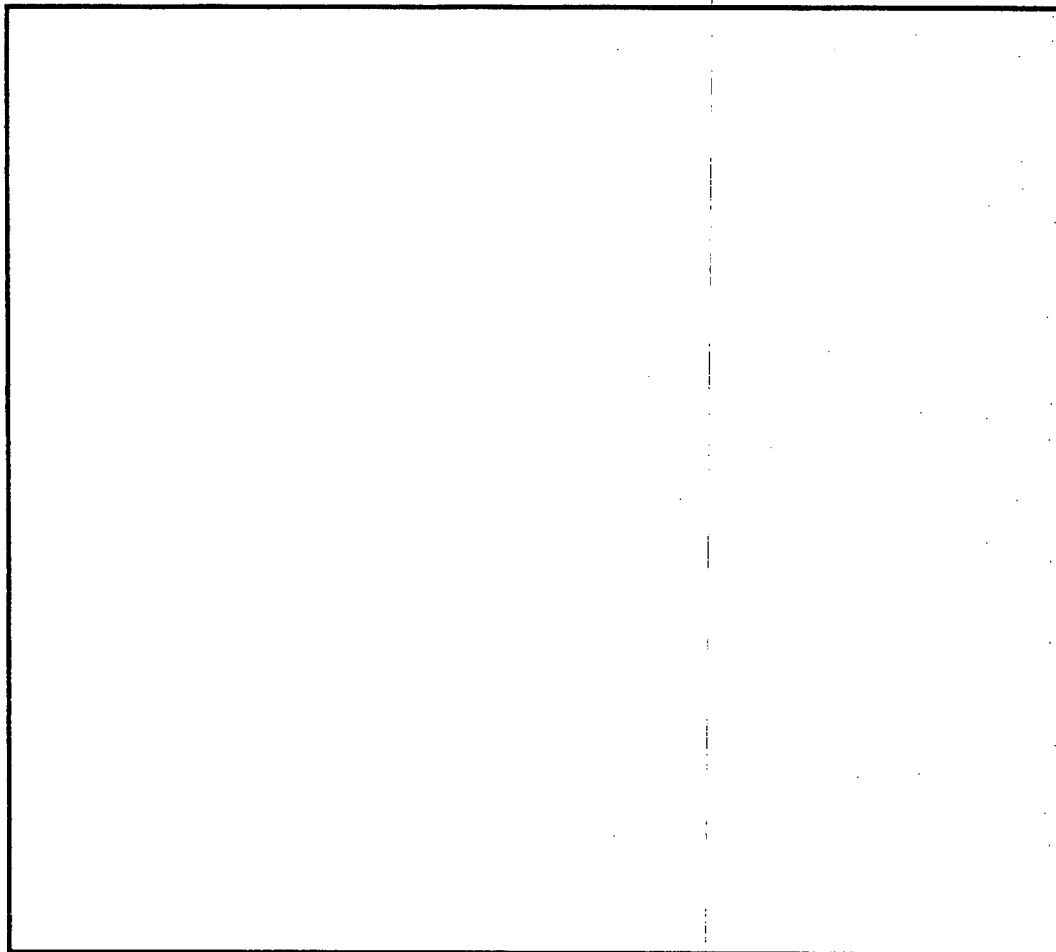
Instrucciones para el diligenciamiento del presente formulario, ver reverso de esta página.

PI02-F06 (2008-06-09)

10 Anexos

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.
- ☒ Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.
- ☒ Poderes, si fuere el caso, junto con la sustitución del mismo a mi favor
- ☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.
- ☐ Declaraciones.
- ☒ Copia de la solicitud internacional (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos).
- ☒ Traducción de la solicitud internacional al castellano (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos).
- ☐ Copia del examen preliminar internacional efectuado por la Autoridad Internacional de Examen Preliminar (IPEA).
- ☐ Traducción del examen preliminar internacional efectuado por la IPEA.
- ☐ De ser el caso, copia del contrato de acceso.
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.
- ☐ De ser el caso, certificado de depósito del material biológico.
- ☐ Arte final 12x12
- ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- ☐ De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional.
- ☒ Otros: Tarjeta Propietario, Extracto para la publicación

11 FIGURA CARACTERISTICA:



12 Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: MARGARITA CASTELLANOS ABONDANO

FIRMA:

C.C. No. 39779.654 Usaquén - TPA 70.819 C.S.J.

23 SET. 2010

CASTELLANOS & CO LTDA
ABOGADOS
Calle 94 A No. 7 A-09
Bogotá, D.C. - COLOMBIA

**ANEXO # 1
INVENTORES**

1. **BERNHARD K. MÜLLER**
Altbachstr. 10 A
67435 Neustadt/Weinstrasse
ALEMANIA
2. **MARTIN SCHMIDT**
Mittelstrasse 49 b
64625 Bensheim
ALEMANIA
3. **EVE H. BARLOW**
4 Jefferson Road
Wellesley 02481
ESTADOS UNIDOS DE AMERICA
4. **MARY R. LEDDY**
72 Peters Way
North Attleborough 02760
ESTADOS UNIDOS DE AMERICA
5. **CHUNGMING HSIEH**
22 Olde Field Road
Newton 02459-2733
ESTADOS UNIDOS DE AMERICA
6. **PHILLIP D. BARDWELL**
258 Shawmut Ave
Boston 02118
ESTADOS UNIDOS DE AMERICA



Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

Espacio reservado para el adhesivo de radicación

FORMULARIO ÚNICO DE CORRECCIONES Y MODIFICACIONES

①

SOLICITUD DE:

☐ Corrección de Error Material

☒ Modificación a una solicitud

②

SOLICITANTE

Nombre: 1. ABBOTT GMBH & CO. KG y
2. ABBOTT LABORATORIES
Dirección: 1. Max-Plack-Ring 2
65205 Weisbaden
ALEMANIA y
2. 100 Abbott Park Road
Abbott Park, Illinois 60064
ESTADOS UNIDOS DE AMERICA
Domicilio: 1. Weisbaden - ALEMANIA y
2. Abbott Park, Illinois - ESTADOS
UNIDOS DE AMERICA
Lugar de Constitución: ALEMANIA y
ESTADOS UNIDOS DE AMERICA

Teléfono: Fax:
E-mail:

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☐ NIT ☐

C.E. ☐ Otro ☐

Cual _____

Número _____

③

REPRESENTANTE
O APODERADO

Nombre: MARGARITA CASTELLANOS A.
Dirección: CALLE 94A No. 7A-09
Teléfono: 756 07 70 Fax: 755 01 58
E-mail: info@castellanosyco.com

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☒ NIT ☐

C.E. ☐ Otro ☐

Cual _____

Número 39'779.654 TPA 70.819

④

Número de Expediente:

10.117.825

⑤

Descripción de la corrección o modificación solicitada:

Presento nuevo pliego reivindicatorio con 11 reivindicaciones sobre el cual solicito se realice el examen de patentabilidad.

⑥

Comprobante de pago No.

12-001336

11-113535

12-001333

Fecha

04/01/2012

22/11/2011

04/01/2012

⑦

Anexos:

☒ Comprobante de pago de la tasa.

☐ Poderes si fuere el caso, junto con la sustitución de los mismos a mi favor.

☐ Documento que acredita la existencia y representación legal de las partes, cuando sean personas jurídicas

☒ Nuevo capítulo reivindicatorio

⑧

NOMBRE MARGARITA CASTELLANOS A.

FIRMA Margarita Castellanos A.
CC 39'779.654 Usaquén - TPA 70.819 CSJ

Instrucciones para el diligenciamiento del presente formulario, ver reverso de esta página - MCA/zca-P2031

05 MAR. 2012

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -

 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	RECIBO DE CAJA	No. 12 - 001336
		Bogotá D.C., Enero 04 de 2012 - 16:35:06

RECIBIDO DE : CASTELLANOS Y Y CO	NI 800.174.641
----------------------------------	----------------

*** Soporte del Pago ***					
TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	181521583	04/01/2012	5.914.400.00

*** Conceptos Pagados ***			
CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO Vr.CONCEPTO
1	50005-01-03	CAMBIO DE MODALIDAD Y MODIFICACION DE MARCAS Y LEMAS COMERCIALES	120.000.00 120.000.00
			\$120.000.00
			=====

SON: **CIENTO VEINTE MIL PESOS MONEDA CORRIENTE**

Responsable: _____
Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 10-117825- -00006-0000
Fecha: 2012-03-05 15:13:55 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 449 RESPUESOPOSICI Folios: 225

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 10-117825-A-00000-0000
Fecha: 2013-03-05 17:31:29 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 223

5
6



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

Espacio reservado para el adhesivo de radicación

FORMULARIO ÚNICO DE CONVERSIÓN, DIVISIÓN Y FUSIÓN DE SOLICITUDES

①

SOLICITUD DE :

☐

Conversión

☒

División

☐

Fusión

☒

Patente de Invención

☐

Patente de Modelo de Utilidad

☐

Registro de Diseño Industrial

☐

Esquema de Trazado para Circuitos Integrados

②

SOLICITANTE

Nombre: 1. ABBOTT GMBH & CO. KG y
2. ABBOTT LABORATORIES
Dirección: 1. Max-Plack-Ring 2
65205 Weisbaden
ALEMANIA y
2. 100 Abbott Park Road
Abbott Park, Illinois 60064
ESTADOS UNIDOS DE AMERICA
Domicilio: 1. Weisbaden - ALEMANIA y
2. Abbott Park, Illinois - ESTADOS
UNIDOS DE AMERICA
Lugar de Constitución: ALEMANIA y
ESTADOS UNIDOS DE AMERICA

Teléfono: Fax:
E-mail:

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☐ NIT ☐

C.E. ☐ Otro ☐

Cual _____

Número _____

③

REPRESENTANTE
O APODERADO

Nombre: MARGARITA CASTELLANOS A.
Dirección: CALLE 94A No. 7A-09
Teléfono: 7560770 Fax: 7550158
E-mail: info@castellanosyco.com

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☒ NIT ☐

C.E. ☐ Otro ☐

Cual _____

Número 39.779.654 TP 70.819

④

CONVERSIÓN

Expediente No. _____

De: _____

A: _____

⑤

DIVISIÓN

Expediente No. 10.117.825

No. de divisionales: 1

⑥

FUSIÓN

Expediente No. _____

Expediente No. _____

⑦

Comprobante de pago No.

12-0021736
12-0021738

Fecha
Fecha

01/03/2012
01/03/2012

⑧

Anexos:

☒

Comprobante de pago de la tasa.

☐

Poderes, si fuere el caso.

☐

Documento que acredite la existencia y representación legal de las partes, cuando sean personas jurídicas

☒

Copia de la Solicitud divisional

⑨

NOMBRE MARGARITA CASTELLANOS A.

FIRMA

Margarita Castellanos A.
C.C. 39.779.654 Usaquén - T.P.A. 70.819 CSJ

Instrucciones para el diligenciamiento del presente formulario, ver reverso de esta página - MCA/gcb - P2444

2031
7

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO NIT : 800.176.089-2 - / -					
Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	RECIBO DE CAJA			No. 12 - 0021736	
				Bogotá D.C., Marzo 01 de 2012 - 14:45:42	
RECIBIDO DE : CASTELLANOS Y Y CO				NI 800.174.641	
*** Soporte del Pago ***					
TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	181521664	01/03/2012	3.210.000.00
*** Conceptos Pagados ***					
CANT. RENTISTICO	CONCEPTO			Vr. UNIDITARIO	Vr. CONCEPTO
1 50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE INVENCIÓN			590.000.00	590.000.00
					\$590.000.00
=====					
SON: **QUINIENTOS NOVENTA MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***					
Responsable: _____					
Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____					
Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia					
Web: www.sic.gov.co e-mai: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240					
, Marzo 1 de 2012 - 14:45:43					

7
43

2031

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO					
NIT : 800.176.089-2					
-/-					
Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	RECIBO DE CAJA			No. 12 - 0021738	
				Bogotá D.C., Marzo 01 de 2012 - 14:45:42	
RECIBIDO DE : CASTELLANOS Y Y CO			NI 800.174.641		
*** Soporte del Pago ***					
TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	181521664	01/03/2012	3.210.000.00
*** Conceptos Pagados ***					
CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO		Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
36	50005-01-01	SOLICITUDES	1607 REIVINDICACION UNITARIA ADICIONAL A LAS 10 INICIALES	30.000.00	1.080.000.00
					\$1.080.000.00
SON: **UN MILL&OACUTE;N OCHENTA MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***					
Responsable: _____					
Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____					
Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia					
Web: www.sic.gov.co e-mai: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240					
Marzo 1 de 2012 - 14:45:44					

8
14

ANTICUERPOS MONOCLONALES CONTRA LA PROTEÍNA RGM A Y SUS USOS

CAMPO TÉCNICO

En esta solicitud se describen proteínas que se unen a RGM A, particularmente anticuerpos monoclonales, y en particular, versiones humanizadas de anticuerpos con
 5 injertos de CDR, que tienen la capacidad de unirse a RGM A y prevenir la unión de las proteínas RGM al receptor RGM A y otras proteínas que se unen a RGM A, por lo que neutralizan la función de RGM A. Estos anticuerpos pueden ser útiles en el tratamiento de diversos estados, incluyendo, no taxativamente, la esclerosis múltiple, el traumatismo cerebral en mamíferos, las lesiones en la médula espinal, el accidente cerebrovascular,
 10 las enfermedades neurodegenerativas y la esquizofrenia.

ANTECEDENTES

La regeneración axonal posterior a una lesión, ataques inflamatorios o enfermedades neurodegenerativas en el sistema nervioso central de los mamíferos (SNC) casi siempre resulta imposible. El resultado depende del equilibrio entre la capacidad
 15 intrínseca de las fibras nerviosas del SNC de desarrollarse nuevamente y los factores inhibidores en el SNC. Estos factores están localizados en el microambiente de la lesión o el sitio donde se localiza el daño, y permiten que ocurra un nuevo desarrollo de manera activa, lo que resulta en la regeneración de los tractos de fibras lesionadas.

Se ha establecido que la mielina generada por los oligodendrocitos en el SNC y las
 20 cicatrices debidas a las lesiones son las estructuras no permisivas más relevantes para el desarrollo axonal en la primera fase de una lesión, ya que provocan el colapso del cono de crecimiento e inhiben el desarrollo de las neuritas, tanto in vitro como in vivo, lo que resulta en la inhibición directa del desarrollo de nuevos axones. Se han identificado las proteínas RGM como los factores de inhibición de mayor importancia en la mielina del
 25 SNC y el tejido axonal (Monnier et al., Nature 419: 392-395, 2002; Schwab et al., Arch. Neurol, 62: 1561-8, 2005a; Schwab et al. Eur. J. Neurosci. 21:1569-76, 2005 b; Hata et al. J. Cell Biol, 173:47-58, 2006; para hallar revisiones, véanse Mueller et al., Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci. 361: 1513-29, 2006; Yamashita et al. Curr. Opin. Neurobiol. 17: 29-34, 2007). Las proteínas RGM se hallan reguladas positivamente en los sitios donde
 30 han ocurrido daños o lesiones, en aquellos seres humanos que están agonizando debido a un traumatismo cerebral o una lesión isquémica (Schwab et al., Arch. Neurol. 62: 1561-8, 2005a), y se hallan reguladas positivamente en los sitios de las lesiones en ratas que presentan lesiones en la médula espinal (Schwab et al. Eur. J. Neurosci. 21:1569-76, 2005 b; Hata et al. J. Cell Biol, 173:47-58, 2006, para hallar revisiones, véanse Mueller et al., Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci. 361: 1513-29, 2006; Yamashita et al. Curr.
 35 Opin. Neurobiol. 17: 29-34, 2007). Además, los primeros datos obtenidos mediante el uso de muestras clínicas de pacientes con esclerosis múltiple y personas saludables permiten

inferir que RGM A humana se halla regulada positivamente en el fluido cerebroespinal de pacientes que sufren MS (datos no presentados).

Para evaluar el potencial de regeneración-promoción de un anticuerpo policlonal específico para RGM A, se administraron los anticuerpos en un modelo de lesiones en la médula espinal entre moderadas y severas, donde se transectó aproximadamente 60% de la médula espinal a nivel torácico 9/10. En el examen histológico se observó que esta lesión había cortado todas las fibras dorsales y laterales del tracto corticospinal. El anticuerpo policlonal específico para RGM A administrado de manera local, a través de una bomba durante dos semanas, indujo la regeneración a larga distancia de las fibras nerviosas lesionadas (Hata et al., J. Cell Biol. 173:47-58, 2006).

Cientos de fibras se extendieron más allá del sitio de la lesión, y las fibras más largas se regeneraron más de 10 mm más allá de la lesión, mientras que no se observaron fibras en regeneración en localizaciones distales respecto de la lesión en los animales tratados con el anticuerpo control. La recuperación funcional de las ratas tratadas con el anticuerpo contra RGM A se vio mejorada significativamente, en comparación con las ratas sometidas a una lesión espinal y tratadas con el anticuerpo control, lo que permite demostrar que RGM A es un inhibidor potente de la neurorregeneración y un blanco valioso para estimular la recuperación en indicaciones caracterizadas por daños en los axones o lesiones en las fibras nerviosas (Hata et al., J. Cell Biol. 173:47-58, 2006; Kyoto et al. Brain Res. 1186: 74-86, 2007). Además, la neutralización de la proteína RGM A con un anticuerpo policlonal bloqueador de la función no solamente estimuló el desarrollo de las fibras nerviosas dañadas en las ratas sometidas a lesiones espinales, sino que también mejoró la formación de sinapsis, lo que permitió que se formaran nuevos circuitos neuronales o se restauraran los circuitos neuronales dañados (Kyoto et al. Brain Res. 1186: 74-86, 2007).

La familia del gen *rgm* abarca tres genes diferentes. Dos de ellos, *rgm a* y *b*, se expresan en el SNC de los mamíferos y dan lugar a las proteínas RGM A y RGM B, mientras que el tercer miembro, *rgm c*, se expresa en la periferia (Mueller et al., Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci. 361: 1513-29, 2006), donde RGM C tiene una función importante en el metabolismo del hierro. In vitro, RGM A inhibe el desarrollo de las neuritas al unirse a la neogenina, que ha sido identificada como un receptor de RGM (Rajagopalan et al. Nat Cell Biol.: 6(8), 756-62, 2004). La neogenina fue descrita por primera vez como una proteína que se une a netrina (Keino-Masu et al. Cell, 87(2):175-85, 1996). Este es un descubrimiento importante, debido a que se ha informado que la unión de la netrina-1 a la neogenina o su receptor relacionado estrechamente, DCC (suprimido en el cáncer colorrectal), estimula el desarrollo de las neuritas en vez de inhibirlo (Braisted et al. J. Neurosci. 20: 5792-801, 2000). Por consiguiente, el bloqueo de

RGM A libera la inhibición del crecimiento mediada por RGM al permitir que la neogenina se una a su ligando estimulador del crecimiento de las neuritas, la netrina. Sobre la base de estas observaciones, puede asumirse que la neutralización de RGM A será superior a la neutralización de la neogenina en modelos de lesiones en la médula espinal humana.

5 Además de la unión de RGM A a la neogenina y la inhibición del crecimiento de las neuritas, la unión de RGM A o B a las proteínas morfogenéticas óseas BMP-2 y BMP-4 podría representar otro obstáculo para una neuroregeneración y una recuperación funcional exitosas (Mueller et al., Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci. 361: 1513-29, 2006).

10 En la técnica existe la necesidad de anticuerpos mejorados capaces de unirse a RGM A, preferiblemente un anticuerpo monoclonal que bloquee RGM A y evite la interacción entre RGM A y su receptor y/o sus proteínas de unión, es decir, la neogenina, BMP-2, BMP-4.

15 En esta solicitud se provee (a) la generación de un anticuerpo monoclonal neutralizador contra RGM A que inhibe selectivamente la unión de RGM A a su receptor, la neogenina, y a las proteínas morfogenéticas óseas 2 y 4 (BMP-2, BMP-4), y (b) la generación de un anticuerpo monoclonal neutralizador contra RGM A que inhibe selectivamente la unión de RGM A a las proteínas morfogenéticas óseas 2 y 4 (BMP-2, BMP-4). Se espera que los anticuerpos monoclonales neutralizadores de la presente
20 invención estimulen el nuevo desarrollo de fibras nerviosas lesionadas o dañadas, y la formación de sinapsis funcionales en las fibras nerviosas en regeneración, ya que uno de los anticuerpos monoclonales neutralizadores de la presente invención parece transformar la naturaleza inhibitoria de RGM A en una condición donde las células neuronales prefieren migrar y desarrollarse en un sustrato de RGM A, y no en un sustrato permisivo,
25 tal como el colágeno I. Además, este anticuerpo es capaz de inducir la regeneración a larga distancia en un modelo de lesión del nervio óptico en rata in vivo, y también potencia la remielinización de fibras nerviosas lesionadas y en regeneración.

30 Por ende, se espera que los anticuerpos monoclonales neutralizadores de la presente invención promuevan la regeneración neuronal y el nuevo desarrollo de las conexiones neuronales dañadas o rotas en el SNC humano dañado e inflamado, por ejemplo, en la esclerosis múltiple, después de lesiones agudas en la médula espinal o traumatismo cerebral, o en enfermedades neurodegenerativas, tales como, por ejemplo, la corea de Huntington, la enfermedad de Parkinson o la enfermedad de Alzheimer.

RESUMEN DE LA INVENCION

De acuerdo con un aspecto, en la presente invención se provee una proteína de unión que se disocia de RGM A humana (hRGM A) con una K_D de 1×10^{-7} M o menos, y una constante k_{off} de 1×10^{-2} s⁻¹ o menos, ambas determinadas por resonancia de
5 plasmón superficial.

De acuerdo con otro aspecto, la invención se relaciona con una proteína de unión, tal como, por ejemplo, una proteína de unión que presenta las características cinéticas anteriores, se une a RGM A humana y neutraliza la actividad de inhibición del desarrollo de las neuritas de RGM A humana, lo cual puede determinarse con un ensayo in vitro
10 convencional, tal como, por ejemplo, el ensayo de desarrollo de neuronas NTera que se describirá en el ejemplo 3 más adelante.

La invención también se relaciona con una proteína de unión como se definió con anterioridad, que tiene al menos una de las siguientes características funcionales adicionales:

- 15 unión a RGM A de rata,
- unión a RGM C humana, y
- unión a RGM C de rata.

En particular, la proteína de unión que se describe en la presente documentación modula la capacidad de RGM de unirse a al menos uno de sus receptores.

20 En particular, esta proteína de unión se une al dominio de unión de un receptor de RGM A humana. Se han identificado los dominios de unión a RGM A de los extremos N y C del receptor. Las realizaciones particulares de las proteínas de unión de la invención se unen al dominio de unión del extremo N del receptor de RGM A, como lo ilustra la inhibición de la unión entre un fragmento N-terminal de hRGM A, tal como, por ejemplo,
25 47-168, y moléculas receptoras, tales como la neogenina y BMP-4. Dicho fragmento N-terminal de hRGM A puede tener una longitud total de entre aproximadamente 30 y aproximadamente 150, o entre aproximadamente 30 y aproximadamente 122 residuos de aminoácidos. A modo de ejemplo no limitativo, puede mencionarse el fragmento 0 (que corresponde a los residuos N-terminales 47-168) de hRGM A, que se describe en la
30 presente documentación, o cualquier fragmento de unión al receptor más corto.

En particular, dicha proteína de unión modula, preferiblemente inhibe al menos una de las siguientes interacciones:

- unión de RGM humana A a BMP-4 humana,
- unión de hRGM A a la neogenina humana,
- 35 unión de hRGM C a la neogenina humana,
- unión de RGM A humana a BMP-2 humana.

13

De acuerdo con una realización particular, la proteína de unión definida en la presente documentación es un anticuerpo humanizado.

La proteína de unión descrita con anterioridad puede tener un dominio de unión a antígeno, y dicha proteína de unión puede ser capaz de unirse a un epítopo de una molécula RGM, donde dicho dominio de unión a antígeno comprende al menos una CDR que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en

5 GTTPDY (SEQ ID N° 59),
FQATHDPLT (SEQ ID N° 62),
ARRNEYYGSSFFDY (SEQ ID N° 65),
LQGYIPRT (SEQ ID N° 68), y

secuencias de aminoácidos de CDR modificadas que tienen una identidad de secuencia de al menos 50% con una de dichas secuencias.

En otra realización, presente invención se relaciona con una proteína de unión que comprende un dominio de unión a antígeno, donde dicha proteína de unión es capaz de unirse a un epítopo de una molécula RGM, donde dicho dominio de unión a antígeno comprende al menos una CDR que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en

10 GTTPDY (SEQ ID N° 59),
FQATHDPLT (SEQ ID N° 62),
ARRNEYYGSSFFDY (SEQ ID N° 65),
LQGYIPRT (SEQ ID N° 68), y

secuencias de aminoácidos de CDR modificadas que tienen una identidad de secuencia de al menos 50%, tal como, por ejemplo, al menos 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95%, con una de dichas secuencias.

15

Por ejemplo, dicha proteína de unión puede comprender dos de dichas CDR, tal como, por ejemplo, SEQ ID N° 59 y 62, o SEQ ID N° 65 y 68, donde al menos una de dichas CDR puede haber sido modificada y tiene una identidad de secuencia de al menos

20 50%, tal como, por ejemplo, al menos 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95%, con una de dichas secuencias.

Dicha proteína de unión también puede comprender al menos una CDR que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID N° 57, 58, 60, 61, 63, 64, 66, 67, y secuencias de aminoácidos de CDR modificadas que tienen una identidad de secuencia de al menos 50%, tal como, por ejemplo, al menos

25 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95%, con una de dichas secuencias.

En otra realización, se provee una proteína de unión donde dicha al menos una CDR comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en

SEQ ID N° 57 Residuos 31-35 de SEQ ID N° 34

13
10

SEQ ID N° 58	Residuos 50-66 de SEQ ID N° 34
SEQ ID N° 59	Residuos 99-104 de SEQ ID N° 34
SEQ ID N° 60	Residuos 24-39 de SEQ ID N° 10
SEQ ID N° 61	Residuos 55-61 de SEQ ID N° 10
SEQ ID N° 62	Residuos 94-102 de SEQ ID N° 10
SEQ ID N° 63	Residuos 31-35 de SEQ ID N° 55
SEQ ID N° 64	Residuos 50-66 de SEQ ID N° 55
SEQ ID N° 65	Residuos 97-110 de SEQ ID N° 55
SEQ ID N° 66	Residuos 24-34 de SEQ ID N° 56
SEQ ID N° 67	Residuos 50-56 de SEQ ID N° 56
SEQ ID N° 68	Residuos 89-97 de SEQ ID N° 56.

En una realización particular, dicha proteína de unión comprende al menos 3 CDR que se seleccionan entre un conjunto de CDR de dominios variables que consiste en

Conjunto VH 5F9

VH 5F9 CDR-H1	Residuos 31-35 de SEQ ID N° 34	SEQ ID N° 57
VH 5F9 CDR-H2	Residuos 50-66 de SEQ ID N° 34	SEQ ID N° 58
VH 5F9 CDR-H3	Residuos 99-104 de SEQ ID N° 34	SEQ ID N° 59

Conjunto VL 5F9

VL 5F9 CDR-L1	Residuos 24-39 de SEQ ID N° 10	SEQ ID N° 60
VL 5F9 CDR-L2	Residuos 55-61 de SEQ ID N° 10	SEQ ID N° 61
VL 5F9 CDR-L3	Residuos 94-102 de SEQ ID N° 10	SEQ ID N° 62

Conjunto VH 8D1

VH 8D1 CDR-H1	Residuos 31-35 de SEQ ID N° 55	SEQ ID N° 63
VH 8D1 CDR-H2	Residuos 50-66 de SEQ ID N° 55	SEQ ID N° 64
VH 8D1 CDR-H3	Residuos 97-110 de SEQ ID N° 55	SEQ ID N° 65

Conjunto VL 8D1

VL 8D1 CDR-L1	Residuos 24-34 de SEQ ID N° 56	SEQ ID N° 66
VL 8D1 CDR-L2	Residuos 50-56 de SEQ ID N° 56	SEQ ID N° 67
VL 8D1 CDR-L3	Residuos 89-97 de SEQ ID N° 57	SEQ ID N° 68,

5 o un conjunto de dominios variables donde al menos una de dichas 3 CDR es una secuencia de aminoácidos de una CDR modificada que tiene una identidad de secuencia

de al menos 50%, tal como, por ejemplo, al menos 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95%, con la secuencia progenitora.

En particular, cada una de las modificaciones mencionadas con anterioridad puede generarse mediante la adición, la supresión, o en particular, la sustitución de uno o varios aminoácidos, o combinaciones de las anteriores.

En otra realización, la proteína de unión comprende al menos dos conjuntos de CDR de dominios variables.

En particular, dichos al menos dos conjuntos de CDR de dominios variables se seleccionan del grupo que consiste en

- Conjunto VH 5F9 y Conjunto VL 5F9, y
- Conjunto VH 8D1 y Conjunto VL 8D1.

La proteína de unión de acuerdo con la invención comprende además un marco aceptor humano.

Dicho marco aceptor humano puede comprender al menos una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID N° 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32 y 33.

En particular, la proteína de unión de la invención puede comprender al menos un conjunto de secuencias de marco seleccionado del grupo que consiste en los siguientes conjuntos:

- (1) Conjunto VH3-48 (SEQ ID N° 15, 16 y 17)
- Conjunto VH3-33 (SEQ ID N° 21, 22 y 23)
- Conjunto VH3-23 (SEQ ID N° 24, 25 y 26),

cada uno de los cuales está combinado con otra secuencia de marco seleccionada entre

- JH3 (SEQ ID N° 18),
- JH4 (SEQ ID N° 19),
- JH6 (SEQ ID N° 20);

o

(2) se selecciona del grupo que consiste en los siguientes conjuntos:

- Conjunto A18: (SEQ ID N° 27, 28 y 29)
- Conjunto A17: (SEQ ID N° 31, 32 y 33),

cada uno de los cuales está combinado con otra secuencia de marco seleccionada entre JK2 (SEQ ID N° 2).

De acuerdo con realizaciones particulares, la proteína de unión de cualquiera de las reivindicaciones precedentes comprende al menos un dominio variable de la cadena pesada con un injerto de CDR seleccionado entre SEQ ID N° 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42 y 43, y/o al menos un dominio variable de la cadena liviana con un injerto de CDR seleccionado entre SEQ ID N° 44, 45 y 46.

Más particularmente, la proteína de unión de la invención comprende una combinación de dos dominios variables, donde dichos dos dominios variables tienen secuencias de aminoácidos que se seleccionan entre

- SEQ ID N° 35 y 44, 36 y 44, 37 y 44, 38 y 44, 39 y 44, 40 y 44, 41 y 44, 42 y 44, 43 y 44;
5 SEQ ID N° 35 y 45, 36 y 45, 37 y 45, 38 y 45, 39 y 45, 40 y 45, 41 y 45, 42 y 45, 43 y 45;
SEQ ID N° 35 y 46, 36 y 46, 37 y 46, 38 y 46, 39 y 46, 40 y 46, 41 y 46, 42 y 46, 43 y 46.

En otra realización de la invención, el marco aceptor humano de dicha proteína de unión comprende al menos una sustitución de un residuo de aminoácido clave en dicha región del marco, donde dicho residuo clave se selecciona del grupo que consiste en

- 10 un residuo adyacente a una CDR;
un residuo de un sitio de glicosilación;
un residuo raro;
un residuo capaz de interactuar con un epítopo de RGM;
un residuo capaz de interactuar con una CDR;
15 un residuo canónico;
un residuo de contacto entre la región variable de la cadena pesada y la región variable de la cadena liviana;
un residuo en una zona Vernier;
un residuo en el extremo N capaz de formar paraglutamato, y
20 un residuo en una región de superposición entre una cadena pesada variable CDR1, tal como la define Chotia, y el primer marco de una cadena pesada, tal como la define Kabat.

- En particular, dichos residuos clave se seleccionan del grupo que consiste en
(posición de la secuencia de la cadena pesada): 1, 5, 37, 48, 49, 88, 98;
25 (posición de la secuencia de la cadena liviana): 2, 4, 41, 51.

En una realización particular, la proteína de unión de la invención es o comprende un dominio variable consenso humano.

- De acuerdo con otra realización de la proteína de unión de la invención, dicho marco aceptor humano comprende al menos una sustitución de aminoácidos en la región
30 del marco, donde la secuencia de aminoácidos del marco es al menos 65%, tal como, por ejemplo, al menos 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 ó 99% idéntica a la secuencia de dicho marco aceptor humano, y comprende al menos 70 residuos de aminoácidos, tal como, por ejemplo, al menos 75, 80 u 85 residuos, que son idénticos a los de dicho marco aceptor humano.

- 35 De acuerdo con realización particular, la proteína de unión de la invención comprende al menos un dominio variable de marco mutado que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en

SEQ ID N° 47, 48, 49, 50 (domino VH); y/o
seleccionada del grupo que consiste en

SEQ ID N° 51, 52, 53 y 54 (domino VL).

En particular, dicha proteína de unión comprende dos dominios variables
5 opcionalmente mutados, donde dichos dos dominios variables tienen secuencias de
aminoácidos que se seleccionan de los grupos que consisten en
SEQ ID N° 47 y 44, 47 y 45, 47 y 46, 47 y 51, 47 y 52, 47 y 53, 47 y 54;
SEQ ID N° 48 y 44, 48 y 45, 48 y 46, 48 y 51, 48 y 52, 48 y 53, 48 y 54;
SEQ ID N° 49 y 44, 49 y 45, 49 y 46, 49 y 51, 49 y 52, 49 y 53, 49 y 54;
10 SEQ ID N° 50 y 44, 50 y 45, 50 y 46, 50 y 51, 50 y 52, 50 y 53, 50 y 54.

Las proteínas de unión de la invención descritas en la presente documentación
pueden unirse a al menos un blanco seleccionado entre moléculas RGM.

En particular, pueden unirse a RGM A humana, y opcionalmente al menos otra
molécula RGM de origen humano, u originada en monos macacos, ratas, pollos, anfibios
15 o peces.

Por ejemplo, pueden unirse adicionalmente a RGM A de rata, RGM C humana y/o
RGM C de rata.

En particular, la proteína de unión de la invención puede modular, en particular,
puede neutralizar o inhibir una función biológica de un blanco seleccionado entre las
20 moléculas RGM definidas con anterioridad.

En particular, la proteína de unión de la invención modula, en particular, disminuye
la capacidad de RGM de unirse a al menos uno de sus receptores, tal como, por ejemplo,
la neogenina, y las BMP, tales como BMP-2 y BMP-4.

Por ejemplo dicha proteína de unión modula, en particular, disminuye, y
25 preferiblemente inhibe al menos una de las siguientes interacciones:

unión de RGM humana A a BMP-4 humana,
unión de hRGM A a la neogenina humana,
unión de hRGM C a la neogenina humana,
unión de RGM A humana a BMP-2 humana.

30 Las proteínas de unión con distintas combinaciones de características funcionales,
que en consecuencia, presentan otros perfiles funcionales, tal como se describe en la
presente documentación, también se hallan dentro del alcance de la invención. A
continuación se detallan ejemplos no limitativos de estos perfiles:

35

Característica	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
Unión a RGM A humana	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Unión a RGM A de rata	+	-	+	-	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+		+
Unión a RGM C humana	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+
Unión a RGM C de rata	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+
Inhibición de la unión de hRGM A a la neogenina humana	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Inhibición de la unión de hRGM C a la neogenina humana	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
Inhibición de la unión de RGM A humana a BMP-2 humana	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Inhibición de la unión de RGM A humana a BMP-4 humana	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Por ejemplo, el perfil 1 es satisfecho por el anticuerpo 5F9, como se lo provee en la presente invención, y los derivados de éste descritos en la presente documentación.

Por ejemplo, el perfil 2 es satisfecho por el anticuerpo 8D1, como se lo provee en la presente invención, y los derivados de éste descritos en la presente documentación.

5

En particular, una proteína de unión de la invención es capaz de inhibir al menos una actividad biológica de RGM, en particular, RGM A, donde dicha RGM A se selecciona entre RGM A humana, de monos macacos, ratas, pollos, anfibios y peces.

De acuerdo con otra realización, la proteína de unión de la invención tiene una o más de las siguientes características cinéticas:

- 5 (a) una constante de activación (k_{on}) con relación a dicho blanco seleccionada del grupo que consiste en al menos aproximadamente $10^2 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, al menos aproximadamente $10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, al menos aproximadamente $10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, al menos aproximadamente $10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, al menos aproximadamente $10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, y al menos aproximadamente $10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, medida por resonancia de plasmón superficial,
- 10 (b) una constante de desactivación (k_{off}) con relación a dicho blanco seleccionada del grupo que consiste en a lo sumo aproximadamente 10^{-2} s^{-1} , a lo sumo aproximadamente 10^{-3} s^{-1} , a lo sumo aproximadamente 10^{-4} s^{-1} , a lo sumo aproximadamente 10^{-5} s^{-1} , y a lo sumo aproximadamente 10^{-6} s^{-1} , medida por resonancia de plasmón superficial, o
- 15 (c) una constante de disociación (K_D) con relación a dicho blanco seleccionada del grupo que consiste en a lo sumo aproximadamente 10^{-7} M , a lo sumo aproximadamente 10^{-8} M , a lo sumo aproximadamente 10^{-9} M , a lo sumo aproximadamente 10^{-10} M , a lo sumo aproximadamente 10^{-11} M , a lo sumo aproximadamente 10^{-12} M , y a lo sumo 10^{-13} M .

De acuerdo con otro aspecto, en la presente invención se provee una construcción de anticuerpos que comprende una proteína de unión descrita con anterioridad, donde
20 dicha construcción de anticuerpos comprende además un polipéptido conector o un dominio constante de inmunoglobulina.

Dicha construcción de anticuerpos o dicha proteína de unión de la invención pueden seleccionarse del grupo que consiste en una molécula de inmunoglobulina, un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo con un injerto de CDR, un
25 anticuerpo humanizado, un Fab, un Fab', un F(ab')₂, un Fv, un Fv con enlaces disulfuro, un scFv, un anticuerpo de un solo dominio, un diacuerpo, un anticuerpo multispecífico, un anticuerpo de especificidad doble, una inmunoglobulina con dos dominios variables y un anticuerpo biespecífico.

En una construcción de anticuerpos de acuerdo con la invención, dicha proteína de
30 unión comprende un dominio constante de la cadena pesada de la inmunoglobulina seleccionado del grupo que consiste en

- un dominio constante de la IgM humana,
un dominio constante de la IgG1 humana,
un dominio constante de la IgG2 humana,
35 un dominio constante de la IgG3 humana,
un dominio constante de la IgG4 humana,
un dominio constante de la IgGE humana,

- un dominio constante de la IgGD humana,
un dominio constante de la IgGA1 humana,
un dominio constante de la IgGA2 humana,
un dominio constante de la IgGY humana, y
5 los dominios constantes mutados correspondientes.

En particular, una construcción de anticuerpos de acuerdo con la invención comprende un dominio constante de inmunoglobulina que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID N° 11, 12, 13 y 14.

- De acuerdo con otro aspecto, en la presente invención se provee un conjugado de
10 anticuerpos que comprende una construcción de anticuerpos descrita en la presente documentación, donde dicho conjugado de anticuerpos comprende además un agente seleccionado del grupo que consiste en una molécula de inmunoadhesión, un agente para el diagnóstico por imágenes, un agente terapéutico y un agente citotóxico, cada uno de los cuales está conjugado, por ejemplo, unido de manera covalente a dicha proteína de
15 unión.

- Por ejemplo, dicho agente es un agente para el diagnóstico por imágenes seleccionado del grupo que consiste en una radiomarca, una enzima, una marca fluorescente, una marca luminiscente, una marca bioluminiscente, una marca magnética, y biotina. En particular, dicho agente para el diagnóstico por imágenes es una radiomarca
20 seleccionada del grupo que consiste en ^3H , ^{14}C , ^{35}S , ^{90}Y , ^{99}Tc , ^{111}In , ^{125}I , ^{131}I , ^{177}Lu , ^{166}Ho y ^{153}Sm .

- Por ejemplo, dicho agente es un agente terapéutico o citotóxico seleccionado del grupo que consiste en un antimetabolito, un agente alquilante, un antibiótico, un factor de crecimiento, una citoquina, un agente antiangiogénico, un agente antimitótico, una
25 antraciclina, una toxina y un agente apoptótico.

De acuerdo con otra realización, la proteína de unión de la invención descrita en la presente documentación posee un patrón de glicosilación humano.

- Además, las proteínas de unión, las construcciones de anticuerpos y los conjugados de anticuerpos de acuerdo con la invención pueden existir como cristales (en
30 forma cristalina) que preferiblemente retienen la actividad biológica.

- En particular, dicho cristal es un cristal farmacéutico de liberación controlada libre de vehículo. Teniendo en cuenta dicha forma cristalina, la proteína de unión, la construcción de anticuerpos o el conjugado de anticuerpos pueden tener una vida media in vivo más prolongada que su contraparte soluble correspondiente.

- 35 En otro aspecto de la presente invención, se provee un ácido nucleico aislado que codifica una secuencia de aminoácidos de una proteína de unión, una secuencia de

aminoácidos de una construcción de anticuerpos y una secuencia de aminoácidos de un conjugado de anticuerpos, como se las describe en la presente documentación.

La invención también se relaciona con un vector que comprende un ácido nucleico aislado, como se describe en la presente documentación. En particular, el vector se
5 selecciona del grupo que consiste en pcDNA, pTT, pTT3, pEFBOS, pBV, pJV y pBJ.

La invención también se relaciona con una célula huésped que comprende dicho vector. En particular, dicha célula huésped es una célula procariota, tal como, por ejemplo, *E. coli*, o una célula eucariota, y puede seleccionarse del grupo que consiste en una célula
10 protista, una célula animal, una célula vegetal y una célula fúngica. En particular, dicha célula eucariota es una célula animal seleccionada del grupo que consiste en una célula de mamífero, una célula de ave y una célula de insecto. Preferiblemente, dicha célula huésped se selecciona entre células HEK, células CHO, células COS y células de levadura. La levadura puede ser *Saccharomyces cerevisiae*, y dicha célula de insecto puede ser una célula Sf9.

15 En la invención también se provee un método para producir una proteína capaz de unirse a RGM, que comprende cultivar una célula huésped, tal como se la define en la presente documentación, en un medio de cultivo, bajo condiciones apropiadas para producir una proteína de unión capaz de unirse a RGM.

La invención también se relaciona con una proteína producida de acuerdo con
20 dicho método.

En la invención también se provee una composición para la liberación de una proteína de unión, donde dicha composición comprende

- (a) una formulación, donde dicha formulación comprende un producto proteico cristalizado, como se lo define en la presente documentación, y un ingrediente; y
25
- (b) al menos un vehículo polimérico.

Dicho vehículo polimérico puede ser uno o más polímeros seleccionados del grupo que consiste en poli (ácido acrílico), poli (cianoacrilatos), poli (aminoácidos), poli (anhídridos), poli (depsipéptido), poli (ésteres), poli (ácido láctico), poli (ácido láctico-co-glicólico) o PLGA, poli (b-hidroxibutirato), poli (caprolactona), poli (dioxanona), poli
30 (etilenglicol), poli ((hidroxipropil) metacrilamida, poli [(órgano) fosfazeno], poli (orto ésteres), poli (alcohol vinílico), poli (vinilpirrolidona), copolímeros de anhídrido maleico y alquil vinil éter, polioles pluronic, albúmina, alginatos, celulosa y derivados de celulosa, colágeno, fibrina, gelatina, ácido hialurónico, oligosacáridos, glicaminoglicanos, polisacáridos sulfatados, y mezclas y copolímeros de los anteriores.

35 Dicho ingrediente puede seleccionarse del grupo que consiste en albúmina, sacarosa, trehalosa, lactitol, gelatina, hidroxipropil- α -ciclodextrina, metoxipolietilenglicol y polietilenglicol.

De acuerdo con otro aspecto, en la presente invención se provee un método para tratar un mamífero que comprende el paso de administrarle al mamífero una cantidad eficaz de la composición definida en la presente documentación.

De acuerdo con otro aspecto, en la presente invención se provee una composición farmacéutica que comprende el producto (en particular, una proteína de unión, una construcción o un conjugado, como se describió con anterioridad), y un vehículo aceptable para el uso farmacéutico.

Dicho vehículo aceptable para el uso farmacéutico puede funcionar como un coadyuvante útil para incrementar la absorción o la dispersión de dicha proteína de unión.

Por ejemplo, dicho coadyuvante es hialuronidasa.

De acuerdo con otra realización, dicha composición farmacéutica comprende además al menos un agente terapéutico adicional para tratar un trastorno donde la actividad de RGM es perjudicial. Por ejemplo, dicho agente se selecciona del grupo que consiste en un agente terapéutico, un agente para el diagnóstico por imágenes, un agente citotóxico, un inhibidor de la angiogénesis, un inhibidor de quinasas, un bloqueador de una molécula de co-estimulación, un bloqueador de una molécula de adhesión, un anticuerpo anti-citoquina o un fragmento funcional de éste, metotrexato, ciclosporina, rapamicina, FK506, una marca o una señal detectable, un antagonista del TNF, un antirreumático, un relajante muscular, un narcótico, una droga antiinflamatoria no esteroidea (NSAID), un analgésico, un anestésico, un sedante, un anestésico local, un bloqueador neuromuscular, un agente antimicrobiano, un antipsoriático, un corticosteroide, un anabólico esteroideo, una eritropoyetina, un agente de inmunización, una inmunoglobulina, un inmunosupresor, una hormona de crecimiento, una droga para el reemplazo de una hormona, un radiofármaco, un antidepresivo, un antipsicótico, un estimulante, un medicamento para el asma, un agonista beta, un esteroide inhalable, una epinefrina o un análogo, una citoquina, y un antagonista de citoquina.

La presente invención también se relaciona con un método para reducir la actividad de la RGM A que comprende poner en contacto RGM A humana con al menos un producto (en particular, una proteína de unión, una construcción o un conjugado, como se describió con anterioridad), con el fin de reducir la actividad de al menos una RGM A humana.

La presente invención también se relaciona con un método para disminuir la unión de hRGM A a su receptor, la neogenina, en un sujeto que lo necesita, que comprende el paso de administrarle al sujeto un producto de la invención (en particular, una proteína de unión, una construcción o un conjugado, como se describió con anterioridad).

La presente invención también se relaciona con un método para disminuir la unión de hRGM A a la proteína morfogenética ósea 2 y/o la proteína morfogenética ósea 4

(BMP-2 y BMP-4) en un sujeto que lo necesita, que comprende el paso de administrarle al sujeto un producto de la invención (en particular, una proteína de unión, una construcción o un conjugado, como se describió con anterioridad).

5 La presente invención también se relaciona con un método para tratar un sujeto afectado por un trastorno asociado con la actividad de RGM A, que comprende el paso de administrar un producto de la invención (en particular, una proteína de unión, una construcción o un conjugado, como se describió con anterioridad), solo o en combinación con otros agentes terapéuticos.

10 La presente invención también se relaciona con un método para reducir la actividad de RGM A en un sujeto afectado por un trastorno donde la actividad de RGM A es perjudicial, que comprende administrarle al sujeto un producto de la invención (en particular, una proteína de unión, una construcción o un conjugado, como se describió con anterioridad), solo o en combinación con otros agentes terapéuticos.

15 Dicho trastorno preferiblemente comprende enfermedades neurológicas seleccionadas del grupo que comprende la esclerosis lateral amiotrófica, la lesión del plexo braquial, la lesión cerebral, incluyendo la lesión cerebral traumática, la parálisis cerebral, el síndrome de Guillain Barre, la leucodistrofia, la esclerosis múltiple, el síndrome posterior a la poliomielitis, la espina bífida, las lesiones en la médula espinal, la atrofia muscular espinal, los tumores espinales, el accidente cerebrovascular, la mielitis transversal, la demencia, la demencia senil, la alteración cognitiva leve, la demencia relacionada con la enfermedad de Alzheimer, la corea de Huntington, la disquinesia tardía, la hiperquinesia, la manía, el morbo de Parkinson, el síndrome de Steel-Richard, el síndrome de Down, la miastenia grave, el traumatismo nervioso, la amiloidosis vascular, la hemorragia cerebral con amiloidosis, la inflamación cerebral, el trastorno de confusión
20 aguda, la esclerosis lateral amiotrófica, el glaucoma y la enfermedad de Alzheimer.

A continuación se detallarán otros aspectos particulares de la invención.

Una proteína de unión aislada que interactúa específicamente con al menos un epítopo de una proteína hRGM A;
donde dicha proteína aislada es un anticuerpo monoclonal neutralizador, o un fragmento
30 de unión a antígeno de éste;
donde dicho fragmento de unión a antígeno comprende un dominio VH y un dominio VL;
donde dicho anticuerpo neutralizador disminuye la capacidad de hRGM A de unirse a dicho receptor;
donde dicho anticuerpo neutralizador es capaz de inhibir la actividad biológica de hRGM
35 A;
donde dicho anticuerpo reconoce un receptor de RGM Ha seleccionado entre los receptores humanos, de monos macacos, ratas, pollos, anfibios y peces;

- donde dicho anticuerpo reconoce una proteína RGM A que comparte 90% de homología con la secuencia de aminoácidos SEQ ID N° 2;
- donde dicha proteína RGM A es codificada por un ácido nucleico que comparte 90% de homología con la secuencia de ácido nucleico SEQ ID N° 1;
- 5 donde dicho anticuerpo tiene al menos 90% de identidad de secuencia a nivel de los aminoácidos con una secuencia que comprende una región variable de la cadena pesada (región VH) que comprende la secuencia de SEQ ID N° 9 ó 34, o una versión de dicha región VH humanizada y opcionalmente sometida a mutaciones adicionales;
- donde dicho anticuerpo tiene al menos 90% de identidad de secuencia a nivel de los aminoácidos con una secuencia que comprende una región variable de la cadena liviana
- 10 (región VL) que comprende la secuencia de SEQ ID N° 10, o una versión de dicha región VL humanizada y opcionalmente sometida a mutaciones adicionales;
- donde dicho anticuerpo se une a hRGM A, donde el anticuerpo está glicosilado;
- donde dicho anticuerpo o fragmento de unión a antígeno es un anticuerpo de ratón, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo completamente humano, un anticuerpo quimérico,
- 15 un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo humanizado, o un fragmento de unión a antígeno de a anticuerpo quimérico;
- donde dicho anticuerpo o fragmento de unión a antígeno es un fragmento de unión a antígeno seleccionado del grupo que consiste en un fragmento Fab, un fragmento Fab', un fragmento F(ab')₂ y un fragmento Fv;
- 20 donde dicho anticuerpo monoclonal se une específicamente a al menos un epítopo de hRGM A, donde dicho anticuerpo monoclonal es el anticuerpo monoclonal secretado por una línea de células de hibridomas que se describe en la presente documentación;
- donde la unión de dicho anticuerpo monoclonal resulta en la inactivación de la interacción de hRGM A con su receptor;
- 25 donde dicha línea de células de hibridomas produce un anticuerpo monoclonal que se une específicamente a al menos un epítopo de hRGM A;
- donde dicha línea de células de hibridomas se selecciona del grupo que consiste en líneas de células de hibridomas humanos, de ratón, rata, oveja, cerdo, ganado bovino, cabra y caballo; o
- 30 donde la unión de dicho anticuerpo monoclonal resulta en la inactivación de hRGM A;
- donde dicha línea de células de hibridomas produce un anticuerpo monoclonal que se une específicamente a al menos un epítopo de hRGM A;
- donde dicha línea de células de hibridomas se selecciona del grupo que consiste en líneas de células de hibridomas humanos, de ratón, rata, oveja, cerdo, ganado bovino, cabra y caballo;
- 35

25

donde dicho anticuerpo monoclonal neutralizador, o el fragmento de unión a antígeno de éste, tiene al menos una característica seleccionada del grupo que consiste en

- a) unión a RGM A de mamífero con una afinidad en el rango de nM o menor;
- b) antagonismo funcional de la actividad de RGM A en un ensayo de desarrollo de neuritas *in vitro*, con una eficacia μ M, nM, o menor;
- c) inducción de brotación en el modelo de compresión del nervio óptico *in vivo*;
- d) inducción de brotación en el modelo de lesión en la médula espinal *in vivo*;
- e) alivio de lesiones experimentales en la médula espinal *in vivo* al mejorar el desarrollo regenerativo de las fibras nerviosas lesionadas; o
- f) alivio de lesiones experimentales en la médula espinal *in vivo* al promover la formación de sinapsis.

Un ácido nucleico aislado que codifica dicho anticuerpo monoclonal neutralizador o fragmento de unión a antígeno.

- Un vector que comprende dicho ácido nucleico aislado; donde dicho vector se selecciona del grupo que consiste en pcDNA; pTT; pTT3; pEFBOS; pBV; pJV; pHybE y pBJ.

Una célula huésped transformada con dicho vector, donde la célula huésped se selecciona del grupo que consiste en una célula protista, una célula animal, una célula vegetal y una célula fúngica; donde la célula animal es una célula de mamífero seleccionada del grupo que comprende HEK293, CHO y COS.

Una célula huésped transformada con el vector de acuerdo con la reivindicación 24, donde la célula huésped es una célula eucariota.

- Un método para producir una proteína de unión que se une a hRGM A, que comprende cultivar una célula huésped en un medio de cultivo, bajo condiciones apropiadas para producir una proteína de unión que se une a hRGM A.

Una composición farmacéutica que comprende dicho anticuerpo monoclonal o porción de unión a antígeno, y un vehículo aceptable para el uso farmacéutico.

- Un método para disminuir la unión de hRGM A a su receptor, la neogenina, en un sujeto que lo necesita, que comprende el paso de administrarle al sujeto dicho anticuerpo.

Un método para disminuir la unión de hRGM A a la proteína morfogenética ósea 2 y la proteína morfogenética ósea 4 (BMP-2 y BMP-4) en un sujeto que lo necesita, que comprende el paso de administrarle al sujeto dicho anticuerpo.

- Un método para tratar un sujeto afectado por un trastorno asociado con la actividad de RGM A, que comprende el paso de administrar dicho anticuerpo, solo o en combinación con otros agentes terapéuticos.

25
31

Un método para reducir la actividad de RGM A en un sujeto afectado por un trastorno donde la actividad de RGM A es perjudicial, que comprende administrarle al sujeto dicho anticuerpo, solo o en combinación con otros agentes terapéuticos;

5 donde dicho anticuerpo comprende al menos una región VH que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre SEQ ID N° 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42 y 43;

donde dicho anticuerpo comprende al menos una región VL que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre SEQ ID N° 44, 45 y 46;

10 donde dicho anticuerpo está modificado adicionalmente con entre 1 y 5 mutaciones en una secuencia VH o VL;

donde las mutaciones en dicho anticuerpo se seleccionan entre mutaciones en la región del marco y mutaciones en los residuos de Vernier y la interfase VH/VL.

Cualquier mención o referencia a SEQ ID N° 34, tal como se la describe en la presente documentación, se aplica de manera análoga a SEQ ID N° 9.

15 **BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS**

En la **Figura 1A** se ilustra la unión de los anticuerpos monoclonales a hRGM A en un ensayo de ELISA.

En la **Figura 1B** se ilustra la unión de los anticuerpos monoclonales a hRGM A expresada en células HEK 293.

20 En la **Figura 1C** se ilustra la unión de los anticuerpos monoclonales a RGM A de rata expresada en células HEK 293.

En la **Figura 2** se ilustra la unión de RGM A completa a la neogenina. El anticuerpo monoclonal 5F9 inhibe la unión de hRGM A completa unida a fc a la neogenina.

25 En la **Figura 3** se ilustra la unión de RGM A completa a BMP-4. El anticuerpo monoclonal 5F9 inhibe la unión del fragmento de hRGM A completa unida a fc (47- 422) a BMP-4.

30 En la **Figura 4** se ilustra la unión del fragmento 0 de RGM A a BMP-4. El anticuerpo monoclonal 5F9 inhibe la unión de del fragmento 0 de RGM A unida a fc (47- 168) a BMP-4.

En la **Figura 5** se ilustra la unión de RGM A completa a BMP-2. El anticuerpo monoclonal 5F9 inhibe la unión del fragmento de RGM A completa unida a fc (47-422) a BMP-2.

35 La **Figura 6** es una combinación de microfotografías donde se ilustra la neutralización de un fragmento de RGM A por el anticuerpo monoclonal 5F9 en un ensayo de desarrollo de neuritas en células NTera. El anticuerpo monoclonal 5F9 neutraliza la actividad de inhibición del desarrollo de un fragmento inhibidor potente de hRGM A

conjugado con fc en ensayos de desarrollo de neuritas con agregados NTera humanos. (A) Cultivo control, desarrollo de neuronas NTera en laminina, (B) en un sustrato de laminina-fragmento de hRGM A (47-168), (C-E) en un sustrato de laminina-fragmento de hRGM A (47-168), en presencia de 0,1 µg/ml del anticuerpo monoclonal 5F9 (C), 1 µg/ml del anticuerpo monoclonal 5F9 (D), 10 µg/ml del anticuerpo monoclonal 5F9 (E).

En la **Figura 7** se ilustran análisis cuantitativos del ensayo NTera 2. El anticuerpo monoclonal 5F9 neutraliza de una manera dependiente de la dosis la actividad de inhibición del desarrollo de un fragmento inhibidor potente de hRGM A conjugado con fc (fragmento 0, 47-168) en ensayos de desarrollo de neuritas con agregados NTera humanos.

En la **Figura 8** se ilustran análisis cuantitativos del ensayo en bandas SH-SY5Y. El anticuerpo monoclonal 5F9 neutraliza la repulsión inducida por bandas de membrana que consisten en RGM A humana completa sobre células neuronales humanas SH-SY5Y. En ausencia del anticuerpo monoclonal 5F9 (A) o en presencia de concentraciones bajas del anticuerpo monoclonal, las neuronas SH-SY5Y prefieren evitar las bandas de RGM A. Este comportamiento es revertido al incrementar las concentraciones del anticuerpo monoclonal 5F9 (B a D). Con la concentración máxima de anticuerpo monoclonal (10 µg/ml) (E), las neuronas SH-SY5Y presentan una preferencia marcada por las bandas de RGM A, en comparación con las bandas de colágeno I.

En la **Figura 9** se resume el análisis cuantitativo de las características de unión de los anticuerpos monoclonales 5F9 y 8D1. Los anticuerpos monoclonales 5F9 y 8D1 se evalúan en distintas concentraciones en ensayos de unión con hRGM A-neogenina, hRGM A-BMP-2 y hRGM A-BMP-4.

En la **Figura 10** se ilustra la actividad de neutralización de la actividad quimiorrepulsiva de hRGM A de los anticuerpos 5F9 humanizados (h5F9.21, h5F9.23, h5F9.25) en un ensayo de quimiotaxis SH-SY5Y.

En la **Figura 11** se ilustra la actividad neuroregenerativa in vivo de la aplicación local de 5F9 en un modelo animal de lesión en el nervio óptico. La aplicación local del anticuerpo monoclonal 5F9 neutraliza RGM A y estimula el desarrollo regenerativo de los axones del nervio óptico dañado en un modelo de compresión del nervio óptico en rata. En los animales tratados con 5F9 (A), muchas fibras positivas para GAP-43 se extienden más allá del sitio de compresión, en contraste con el anticuerpo monoclonal control 8D1 (B), que no se une a RGM A de rata.

En la **Figura 12 A** y la **Figura 12 B** se ilustran análisis cuantitativos de la aplicación local de 5F9 en un modelo animal de lesión del nervio óptico. (A) 5F9, pero no el anticuerpo monoclonal control 8D1, incrementó significativamente la cantidad de fibras positivas para GAP-43 en regeneración. Se observaron significativamente más fibras ($p <$

20
0,05) en los animales tratados con 5F9 a distancias de 200 μm , 400 μm y 600 μm , y a 1200 μm , solamente se observan fibras en los animales tratados con 5F9, pero no en los animales control. (B) 5F9 incrementó significativamente el área positiva para GAP-43 en el sitio donde se produjo la lesión en el nervio óptico, en comparación con el anticuerpo control 8D1 y el control con vehículo PBS. El área de crecimiento regenerativo (área positiva para GAP-43) se midió usando el software Axiovision (Zeiss).

10 En la **Figura 13** se ilustra la actividad neurorregenerativa in vivo de una aplicación sistémica de 5F9 en un modelo animal de lesión del nervio óptico. Los animales se trataron con 5F9 el día 0 y el día 21, con 2 mg/kg y 10 mg/kg, respectivamente. Se administró el anticuerpo o el vehículo por vía intraperitoneal o intravenosa. Imágenes compuestas de los nervios ópticos de las ratas. En los animales tratados con 5F9 (A), muchas fibras positivas para GAP-43 se extienden más allá del sitio de compresión, en contraste con los animales control tratados con PBS (B). El sitio de compresión está localizado en el margen izquierdo, y las fibras en regeneración han sido coloreadas con un anticuerpo contra GAP-43. Se observan muchas fibras en el borde superior e inferior del nervio óptico en los animales tratados con 5F9, pero no en los animales que recibieron PBS.

En la **Figura 14 A** y la **Figura 14 B** se ilustran los ácidos nucleicos cuantitativos de la aplicación sistémica de 5F9 en un modelo animal de lesión del nervio óptico.

20 En la **Figura 15** se ilustra la actividad de remielinización in vivo de la aplicación sistémica de 5F9 en un modelo animal de lesión del nervio óptico. Los animales se trataron con 5F9 el día 0 y el día 21, con 2 mg/kg y 10 mg/kg, respectivamente. Se administró el anticuerpo o el vehículo por vía intraperitoneal o intravenosa. Imágenes compuestas de los nervios ópticos de las ratas. La mielinización se visualiza usando un anticuerpo dirigido contra la proteína básica de la mielina, MBP, usada como marcador. Los sitios de compresión se localizan en el medio de los nervios compuestos, y el área está libre en los animales control tratados con vehículo (A y B). En los animales tratados con 5F9 (C y D), se observan muchas estructuras positivas para MBP en el área media (centro de compresión) de los nervios ópticos.

30 En la **Figura 16** se ilustra el efecto cuantitativo sobre la remielinización de la aplicación sistémica de 5F9 en un modelo animal de lesión del nervio óptico.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

35 En esta invención se describen proteínas de unión a RGM A, más específicamente, anticuerpos monoclonales contra RGM A, en especial, anticuerpos monoclonales contra RGM A humanizados que se unen a RGM A, o porciones de unión a antígeno de éstos. Diversos aspectos de esta solicitud se relacionan con anticuerpos y fragmentos de anticuerpos, y con composiciones farmacéuticas que los comprenden, así

como con ácidos nucleicos, vectores de expresión recombinantes y células huésped para producir dichos anticuerpos y fragmentos. En la invención también se incluyen métodos para usar los anticuerpos de esta solicitud para detectar RGM A humana; neutralizar RGM humana y/o la actividad de RGM A humana, tanto *in vivo* como *in vitro*, y regular la expresión genética.

1. Definiciones generales

A menos que se los defina de otro modo en la presente documentación, los términos científicos y técnicos usados en conexión con la presente invención tienen los significados que comúnmente les dan aquellos entrenados en la técnica. El significado y el alcance de los términos debería estar claro; sin embargo, en el caso en que haya una ambigüedad latente, las definiciones proporcionadas en la presente documentación tienen prioridad sobre cualquier definición de diccionario o extrínseca. Además, a menos que lo requiera de otro modo el contexto, los términos singulares incluirán pluralidades, y los términos plurales incluirán las formas singulares. En esta solicitud, el uso de "o" denota "y/o", a menos que se indique lo contrario. Además, el uso del término "incluyendo", así como otras formas, tales como "incluye" e "incluido", no es limitativo. También, los términos tales como "elemento" o "componente" abarcan los elementos y los componentes que constituyen una unidad, y los elementos y los componentes que comprenden más de una subunidad, a menos que se indique específicamente lo contrario.

En general, las nomenclaturas usadas en conexión el cultivo de células y tejidos, la biología molecular, la inmunología, la microbiología, la genética y la química y la hibridación de proteínas y ácidos nucleicos descriptas en la presente documentación, y los procedimientos correspondientes, son aquellos bien conocidos y de uso común en la técnica. Los métodos y los procedimientos de la presente invención generalmente se llevan a cabo de acuerdo con métodos convencionales bien conocidos en la técnica y como se describe en diversas referencias generales y más específicas que se citan y se describen en esta memoria descriptiva, a menos que se indique lo contrario. Las reacciones enzimáticas y los procedimientos de purificación se llevan a cabo de acuerdo con las especificaciones del fabricante, como comúnmente se los lleva a cabo en la técnica o como se describe en la presente documentación. Las nomenclaturas usadas en conexión con los procedimientos de laboratorio y los procesos de química analítica, la química de síntesis orgánica y la química farmacéutica descriptas en la presente documentación, y los procedimientos correspondientes, son aquellos bien conocidos y de uso común en la técnica. Se usan técnicas convencionales para la síntesis química, los análisis químicos, las preparaciones farmacéuticas, la formulación, la administración y el tratamiento de los pacientes.

Para que la presente invención pueda ser comprendida con mayor facilidad, a continuación se describirán términos seleccionados.

El término "polipéptido", como se lo usa en la presente documentación, hace referencia a cualquier cadena polimérica de aminoácidos. Los términos "péptido" y "proteína" se usan indistintamente con el término polipéptido, y también hacen referencia a una cadena polimérica de aminoácidos. El término "polipéptido" abarca proteínas nativas o artificiales, fragmentos de proteínas y análogos de polipéptidos de una secuencia de proteína. Un polipéptido puede ser monomérico o polimérico.

El término "proteína aislada" o "polipéptido aislado" hace referencia a una proteína o un polipéptido que, en virtud de su origen o la fuente de la que deriva, no está asociado con los componentes con los que se asocia y que lo acompañan en su estado nativo; se halla sustancialmente libre de otras proteínas de la misma especie; es expresado por una célula de una especie diferente; o no aparece en la naturaleza. Por consiguiente, un polipéptido que es sintetizado por medios químicos o es sintetizado en un sistema celular diferente de la célula en la que se origina naturalmente estará "aislado" de los componentes con los que se halla asociado en la naturaleza. Una proteína también puede liberarse sustancialmente de los componentes con los que se halla asociada en la naturaleza si se la aísla usando procedimientos de purificación de proteínas bien conocidos en la técnica.

El término "recuperar", como se lo usa en la presente documentación, hace referencia al proceso de liberar sustancialmente una especie química, tal como un polipéptido, de los componentes con los que se halla asociada en la naturaleza, aislándola, por ejemplo, por medio de procedimientos de purificación de proteínas bien conocidos en la técnica.

El término "RGM A humana" (abreviado en la presente documentación como hRGM A), como se lo usa en la presente documentación, hace referencia a una glicoproteína anclada con glicosilfosfatidil-inositol (gpi) de 450 aminoácidos, la cual fue descrita por primera vez como un repelente del desarrollo de las neuritas o un inhibidor del crecimiento de las neuritas durante el desarrollo de proyecciones topográficas (Stahl et al Neuron 5: 735-43, 1990; Mueller, en Molecular Basis of Axon Growth and Nerve Pattern Formation, editado por H. Fujisawa, Japan Scientific Societies Press, 215-229, 1997). La familia del gen *rgm* abarca tres genes diferentes. Dos de ellos, *rgm a* y *b*, se expresan en el SNC de los mamíferos y dan lugar a las proteínas RGM A y RGM B, mientras que el tercer miembro, *rgm c*, se expresa en la periferia (Mueller et al., Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci. 361: 1513-29, 2006), donde tiene una función importante en el metabolismo del hierro. Las proteínas RGM humanas tienen una identidad de secuencia de 43%-50%; la homología de aminoácidos entre las RGM A humana y de rata

es de 89%. Las proteínas RGM humanas no comparten una homología de secuencia significativa con cualquier otra proteína conocida. Son proteínas ricas en prolina que contienen una región RGD, presentan homología estructural con el dominio del factor de Von-Willebrand, y son cortadas en el aminoácido N-terminal 168 por una proteasa desconocida para obtener la proteína funcionalmente activa (Mueller et al., Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci. 361: 1513-29, 2006).

In vitro, RGM A inhibe el desarrollo de las neuritas en concentraciones picomolares al unirse a la neogenina, que ha sido identificada como el receptor de RGM (Rajagopalan et al. Nat Cell Biol.: 6(8), 756-62, 2004). La neogenina fue descrita por primera vez como una proteína que se une a netrina (Kéino-Masu et al. Cell, 87(2):175-85, 1996), pero su afinidad por la netrina (K_d 2 nM) es un orden de magnitud inferior a su afinidad por RGM (K_d 0,2 nM) (Rajagopalan et al. Nat Cell Biol.: 6(8), 756-62, 2004). Este es un descubrimiento importante, debido a que se ha informado que la unión de la netrina-1 a la neogenina o su receptor relacionado estrechamente, DCC (suprimido en el cáncer colorrectal), estimula el desarrollo de las neuritas en vez de inhibirlo (Braisted et al. J. Neurosci. 20: 5792-801, 2000).

Además de la unión de RGM A a la neogenina y la inhibición del crecimiento de las neuritas, la unión de RGM A o B a las proteínas morfogenéticas óseas BMP-2 y BMP-4 podría representar otro obstáculo para una neurorregeneración y una recuperación funcional exitosas (Mueller et al., Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci. 361: 1513-29, 2006). Se ha informado que ambas clases de proteínas (neogenina y las BMP) transducen la señal de inhibición del crecimiento de las neuritas de RGM A a través de dos vías de transducción de señales completamente diferentes e independientes. Usualmente, la expresión de estas proteínas BMP es relativamente baja en la mayoría de las regiones del SNC adulto, pero se han descrito incrementos rápidos en la expresión y la acumulación de algunas BMP (por ejemplo, BMP-2, BMP-6, BMP-7) en respuesta a lesiones y daños (Lai et al., Neuroreport 8: 2691-94, 1997; Martinez et al. Brain Res. 894: 1-11, 2001; Hall y Miller, J. Neurosci. Res. 76: 1-8, 2004; Setoguchi et al., Exp. Neurol. 189: 33-44, 2004). Además, en un modelo de esclerosis múltiple, el modelo de encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE), BMP-4, BMP-6 y BMP-7 presentaron una regulación positiva en médula espinal de ratón (Ara et al., J. Neurosci. Res. 86: 125-35, 2008). Se ha informado que BMP-2 inhibe el crecimiento de las neuritas al unirse a RGM A en la superficie de las células, los receptores de BMP I y II, y al activar directamente la LIM-quinasa (Matsuura et al. Biochem Biophys Res Commun., 360: 868-73, 2007), por lo que se espera que el bloqueo de la interacción entre RGM A y BMP-2 permitirá incrementar aún más la recuperación funcional posterior a una lesión en el SNC.

Como se mencionó con anterioridad, las ratas con lesiones en la médula espinal y los seres humanos con lesiones cerebrales presentan acumulaciones masivas de RGM celular en el sitio de la lesión, y el patrón de coloración de RGM A en ratas en el sitio de la lesión espinal es muy similar a la coloración general del anticuerpo RGM en seres humanos, lo que permite inferir que la mayor parte de la coloración general de RGM en los seres humanos está relacionada con la localización de RGM A, pero no la localización de RGM B (Schwab et al., Arch. Neurol, 62: 1561-8, 2005a; Schwab et al. Eur. J. Neurosci. 21:1569-76, 2005 b; Hata et al. J. Cell Biol, 173:47-58, 2006). En el cerebro humano saludable, la coloración general de RGM (inmunorreactividad de RGM A y B) se detectó en las fibras de la materia blanca, los oligodendrocitos, el pericarion de unas pocas neuronas, algunos músculos lisos vasculares y unas pocas células endoteliales. No se observó coloración en los astrocitos. El patrón de coloración de RGM en el cerebro humano adulto saludable es muy similar al patrón de coloración observado en las médulas espinales de ratas adultas (Schwab et al. Eur. J. Neurosci. 21:1569-76, 2005 b; Hata et al. J. Cell Biol. 173:47-58, 2006).

Sobre la base de la acumulación de RGM A en los sitios de las lesiones en el cerebro y las lesiones en la médula espinal, y debido a su actividad de inhibición del crecimiento celular, se espera que la proteína presente actividad de inhibición del crecimiento de las neuritas, por lo que su neutralización por anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de éstos, que se unan a al menos un epítopo de la RGM A humana, resulte en un desarrollo mejorado de las fibras nerviosas lesionadas y una mejora de la recuperación funcional en indicaciones caracterizadas por lesiones en las fibras nerviosas y acumulación de RGM.

A menos que se indique lo contrario, el término "RGM A" también abarca moléculas RGM A aisladas u obtenidas de otras especies, tales como, por ejemplo, roedores, tales como ratones o ratas. Específicamente, la molécula derivada de rata se denomina "RGM A de rata" en la presente documentación.

Tabla 1. Lista de secuencias de de moléculas relacionadas con RGM A

Proteína	Identificador de secuencia	Descripción
hRGM A	SEQ ID N° 2	Secuencia de la proteína RGM A humana
	SEQ ID N° 1	Secuencia de nucleótidos de RGM A humana
hRGM A	SEQ ID N° 4	Secuencia de la proteína RGM A humana-fc
	SEQ ID N° 3	Secuencia de nucleótidos de RGM A humana-fc
hRGM A	SEQ ID N° 6	Secuencia de la cadena liviana de la proteína RGM A humana-fc
	SEQ ID N° 5	Secuencia de nucleótidos de la cadena liviana de la proteína RGM A humana-fc
RGM A de rata	SEQ ID N° 8	Secuencia de la proteína RGM A de rata
	SEQ ID N° 7	Secuencia de nucleótidos de RGM A de rata

La “actividad biológica”, como se la usa en la presente documentación, hace referencia a todas las propiedades biológicas inherentes de RGM A, como se la define en la presente documentación.

Los términos “unión específica” o “unirse específicamente”, como se los usa en la presente documentación con relación a la interacción de un anticuerpo, una proteína o un péptido con una segunda especie química, denotan que la interacción depende de la presencia de una estructura particular (por ejemplo, un determinante antigénico o un “epitope”, como se define a continuación) en la especie química; por ejemplo, un anticuerpo reconoce y se une a una estructura proteica específica en vez de a las proteínas en general. Si un anticuerpo es específico para el epitope “A”, la presencia de una molécula que contiene el epitope A (o A libre, sin marcar) en una reacción que contenga “A” marcado y el anticuerpo reducirá la cantidad de A marcado unido al anticuerpo.

El término “anticuerpo”, como se lo usa en la presente documentación, es una referencia amplia a cualquier molécula de inmunoglobulina (Ig) compuesta por cuatro cadenas de polipéptidos: dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas livianas (L), o cualquier fragmento funcional, mutante, variante o derivación de ésta que retenga las características esenciales de unión a epitopes de una molécula de Ig. Estos formatos de anticuerpos mutantes, variantes o derivados son conocidos en la técnica. A continuación se describirán realizaciones no limitativas de dichos formatos. Se dice que un anticuerpo es “capaz de unirse a” una molécula si es capaz de reaccionar específicamente con la molécula, de modo que la molécula se una al anticuerpo.

Un "anticuerpo monoclonal", como se lo usa en la presente documentación, hace referencia a una preparación de moléculas de anticuerpos que comparten secuencias de aminoácidos comunes para la cadena pesada y la cadena liviana, en contraste con las preparaciones de anticuerpos "policlonales", las cuales contienen una mezcla de distintos anticuerpos. Los anticuerpos monoclonales pueden generarse con diversas tecnologías novedosas, tales como la presentación de fagos, bacterias, levaduras o ribosomas, y también con métodos clásicos, por ejemplo, los anticuerpos derivados de hibridomas (por ejemplo, un anticuerpo secretado por un hibridoma preparado con tecnología de hibridomas, tal como la metodología convencional de Kohler y Milstein ((1975) Nature 256:495-497).

En un anticuerpo completo, cada cadena pesada está compuesta por una región variable de cadena pesada (abreviada HCVR o VH en la presente documentación) y una región constante de cadena pesada. La región constante de cadena pesada está compuesta por tres dominios: CH1, CH2 y CH3. Cada cadena liviana está compuesta por una región variable de dicha cadena liviana (abreviada LCVR o VL en la presente documentación) y una región constante de dicha cadena liviana. La región constante de la cadena liviana consiste en un dominio CL. Las regiones VH y VL pueden dividirse adicionalmente en regiones hipervariables, conocidas como regiones de determinación de la complementariedad (CDR), y separadas por regiones conservadas conocidas como regiones de marco (FR). Cada VH y VL está compuesta por tres CDR y cuatro FR, dispuestas desde el extremo amino hasta el extremo carboxilo en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Las moléculas de inmunoglobulina pueden ser de cualquier tipo (por ejemplo, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA e IgY), clase (por ejemplo, IgG 1, IgG2, IgG 3, IgG4, IgA1 e IgA2) o subclase.

El término "porción de unión a antígeno" o "fragmento de unión a antígeno" de un anticuerpo (o simplemente "porción de anticuerpo" o "fragmento de anticuerpo"), como se lo usa en la presente documentación, hace referencia a uno o más fragmentos de un anticuerpo que retienen la capacidad de unirse específicamente a un antígeno (por ejemplo, hRGM A). Se ha demostrado que la función de unión a antígeno de un anticuerpo puede ser llevada a cabo por fragmentos de un anticuerpo completo. Estas realizaciones de anticuerpos también pueden tener formatos biespecíficos, de especificidad doble o multiespecíficos, es decir, pueden unirse específicamente a dos o más antígenos diferentes. Los ejemplos de fragmentos de unión abarcados por el término "porción de unión a antígeno" de un anticuerpo incluyen (i) un fragmento Fab, un fragmento monovalente que consiste en los dominios VL, VH, CL y CH1; (ii) un fragmento F(ab')₂, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab unidos entre sí en la región bisagra a través de un enlace disulfuro; (iii) un fragmento Fd, que consiste en los

35

dominios VH y CH1; (iv) un fragmento Fv, que consiste en los dominios FL y VH de un solo brazo de un anticuerpo; (v) un fragmento dAb (Ward *et al.*, (1989) *Nature* 341:544-546, Winter *et al.*, publicación PCT WO 90/05144 A1, incorporada en la presente documentación a modo de referencia), que comprende un solo dominio variable; y (vi) una

5 región de determinación de la complementariedad (CDR) aislada. Además, aunque los dos dominios del fragmento Fv, a saber, VL y VH, están codificados por genes separados, pueden conectarse uno con otro usando un conector sintético que les permita prepararlos como una sola cadena de proteína, donde las regiones VL y VH se aparean para formar moléculas monovalentes (conocidas como Fv de cadena simple (scFv); véanse, por

10 ejemplo, Bird *et al.* (1988) *Science* 242:423-426; y Huston *et al.* (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 85:5879-5883). Estos anticuerpos de cadena simple también quedan incluidos dentro del término "porción de unión a antígeno" de un anticuerpo. También se incluyen otras formas de anticuerpos, tales como los diacuerpos. Los diacuerpos son anticuerpos bivalentes y biespecíficos donde los dominios VH y VL se expresan en una

15 sola cadena de polipéptido, pero usando un conector que es demasiado corto para que los dos dominios se combinen en la misma cadena, que lo que se fuerza el apareamiento de dichos dominios con dominios complementarios de una cadena diferente y la formación de dos sitios de unión a antígeno (véanse, por ejemplo, Holliger, P., *et al.* (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6444-6448; Poljak, R.J., *et al.* (1994) *Structure* 2:1121-1123). Estas porciones de unión a anticuerpos son conocidas en la técnica

20 (Kontermann y Dubel eds., *Antibody Engineering* (2001) Springer-Verlag. Nueva York. 790 pp. (ISBN 3-540-41354-5).

El término "anticuerpo construido", como se lo usa en la presente documentación, hace referencia a un polipéptido que comprende una o más porciones de unión a antígeno

25 de la invención, unidas a un polipéptido conector o un dominio constante de inmunoglobulina. Los polipéptidos conectores comprenden dos o más residuos de aminoácidos unidos por enlaces peptídicos, y se usan para unir una o más porciones de unión a antígeno. Estos conectores peptídicos son bien conocidos en la técnica (véanse, por ejemplo, Holliger, P., *et al.* (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6444-6448; Poljak, R.J., *et al.* (1994) *Structure* 2:1121-1123). Un dominio constante de inmunoglobulina hace

30 referencia a un dominio constante de una cadena pesada o liviana. Las secuencias de aminoácidos de los dominios constantes de la cadena pesada y la cadena liviana de la IgG humana son conocidas en la técnica y se representan en la Tabla 2.

35
4X

Tabla 2. Secuencias de dominios constantes de la cadena pesada y dominios constantes de la cadena liviana de la IgG humana

Proteína	Identificador de secuencia	Secuencia
		123456789012345678901234567890
Región constante de Ig gamma-1	SEQ ID Nº 11	ASTKGPSVFFLAPSSKSTSGGTAALG
		CLVK
		DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAV
		LQSS
		GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH
		KPS
		NTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPE
		LLGG
		PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVWV
		DVS
		HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR
		EEQYN
		STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV
		SNKA
		LPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS
		REE
		MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES
		NGQP
		ENNYKTTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK
		SRW
		QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS
		LSPGK

3X

Proteína	Identificador de secuencia	Secuencia
		123456789012345678901234567890
Región constante de Ig gamma-1	SEQ ID Nº 12	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALG CLVK DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAV LQSS GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPS NTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPE AAGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVWV DVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKA LPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS REE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQP ENNYKTTTPVLDSGSSFFLYSKLTVDK SRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPGK
Región constante de Ig Kappa	SEQ ID Nº 13	TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCL LNN FYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESV TEQDS KDSTYLSSTLTLSKADYEEKHKVYACE VTH QGLSSPVTKSFNRGEC

3X
43

Proteína	Identificador de secuencia	Secuencia
		123456789012345678901234567890
Región constante de Ig Lambda	SEQ ID Nº 14	QPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLV CLIS DFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTT PSKQ SNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSC QVTH EGSTVEKTVAPTECS

Adicionalmente, un anticuerpo, o una porción de unión a antígeno de éste, puede ser parte de moléculas de inmunoadhesión más grandes, formadas mediante la asociación covalente o no covalente del anticuerpo o la porción de anticuerpo con una o más proteínas o péptidos. Los ejemplos de estas moléculas de inmunoadhesión incluyen el uso de la región central de la estreptavidina para preparar una molécula de scFv tetramérica (Kipriyanov, S.M., *et al.* (1995) *Human Antibodies and Hybridomas* 6:93-101) y el uso de un residuo de cisteína, un péptido marcador y una marca de polihistidina C-terminal para preparar moléculas scFv bivalentes y biotiniladas (Kipriyanov, S.M., *et al.* (1994) *Mol. Immunol.* 31:1047-1058). Las porciones de los anticuerpos, tales como los fragmentos Fab y F(ab')₂, pueden prepararse a partir de anticuerpos completos usando técnicas convencionales, tales como la digestión con papaína o pepsina, respectivamente, de anticuerpos completos. Más aún, los anticuerpos, las porciones de anticuerpos y las moléculas de inmunoadhesión pueden obtenerse usando técnicas de ADN recombinante, como se describe en la presente documentación.

Un "anticuerpo aislado", como se lo usa en la presente documentación, hace referencia a un anticuerpo que está sustancialmente libre de otros anticuerpos que tienen especificidades antigénicas diferentes (por ejemplo, un anticuerpo aislado que se une específicamente a hRGM A está sustancialmente libre de los anticuerpos que se unen a antígenos distintos de hRGM A). Sin embargo, un anticuerpo aislado que se une a hRGM A puede reaccionar con otros antígenos, tales como moléculas RGM A de otras especies. Más aún, un anticuerpo aislado puede estar sustancialmente libre de otros materiales celulares y/o sustancias químicas.

El término "anticuerpo humano", como se lo usa en la presente documentación, incluye anticuerpos que tiene regiones variables y constantes derivadas de secuencias de secuencias de la línea germinal humana. Los anticuerpos humanos de la invención pueden incluir residuos de aminoácidos no codificados por secuencias de inmunoglobulinas de la línea germinal humana (por ejemplo, mutaciones que han sido

introducidas por mutagénesis al azar o con especificidad de sitio *in vitro*, o por mutaciones somáticas *in vivo*), por ejemplo, en las CDR, y en particular, en CDR3. Sin embargo, el término "anticuerpo humano", como se lo usa en la presente documentación, no incluye anticuerpos donde se han injertado secuencias de CDR derivadas de la línea germinal de otra especie de mamífero, tal como el ratón, en secuencias de regiones de marco humanas.

El término "anticuerpo humano recombinante", como se lo usa en la presente documentación, incluye todos los anticuerpos humanos que se preparan, se expresan, se crean o se aíslan por medios recombinantes, tales como los anticuerpos que se expresan usando un vector de expresión recombinante transfectado en una célula huésped (lo que se describirá más adelante), los anticuerpos aislados de una biblioteca de combinación de anticuerpos humanos recombinantes (Hoogenboom H.R., (1997) *TIB Tech.* 15:62-70; Azzazy H., y Highsmith W.E., (2002) *Clin. Biochem.* 35:425-445; Gavilondo J.V., y Larrick J.W. (2002) *BioTechniques* 29:128-145; Hoogenboom H., y Chames P. (2000) *Immunology Today* 21:371-378), los anticuerpos aislados de un animal (por ejemplo, un ratón) que es transgénico para genes de inmunoglobulina humana (véanse, por ejemplo, Taylor, L. D., et al. (1992) *Nucl. Acids Res.* 20:6287-6295; Kellermann S-A., y Green L.L. (2002) *Current Opinion in Biotechnology* 13:593-597; Little M. et al (2000) *Immunology Today* 21:364-370), o los anticuerpos preparados, expresados, creados o aislados por cualquier otro medio que comprenda la separación específica de secuencias de genes de inmunoglobulina humana para obtener otras secuencias de ADN. Estos anticuerpos humanos recombinantes tendrán regiones variables y constantes derivadas de secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana. Sin embargo, en determinadas realizaciones, estos anticuerpos humanos recombinantes son sometidos a una mutagénesis *in vitro* (o cuando se usa un animal transgénico para secuencias de Ig humana, mutagénesis somática *in vivo*), por lo que las secuencias de aminoácidos de las regiones VH y VL de los anticuerpos recombinantes son secuencias que, si bien derivan y están relacionadas con secuencias VH y VL de la línea germinal, pueden no existir en el repertorio de anticuerpos de la línea germinal humana *in vivo* bajo condiciones naturales.

El término "anticuerpo quimérico" hace referencia a anticuerpos que contienen secuencias de la región variable de las cadenas pesada y liviana de una especie, y secuencias de la región constante de otra especie, tales como anticuerpos que tienen regiones variables de las cadenas pesada y liviana unidas a regiones constantes humanas. El anticuerpo quimérico puede producirse con técnicas recombinantes de biología molecular, o puede ensamblarse mediante una conjugación física.

El término "anticuerpo con una CDR injertada" hace referencia a anticuerpos que comprenden secuencias de regiones variables de las cadenas pesada y liviana de una

especie, pero cuyas secuencias de una o más regiones CDR de VH y/o VL han sido reemplazadas por secuencias CDR de otra especie, tales como anticuerpos que tienen regiones variables de las cadenas pesada y liviana murinas, donde una o más de las CDR murinas (por ejemplo, CDR3) han sido reemplazadas por secuencias CDR humanas.

5 Los términos "numeración de Kabat", "definiciones de Kabat" y "nomenclatura de Kabat" se usan indistintamente en la presente documentación. Estos términos, que son reconocidos en la técnica, hacen referencia a un sistema para numerar los residuos de aminoácidos que son más variables (es decir, hipervariables) que otros residuos de aminoácidos en las regiones variables de las cadenas pesada y liviana de un anticuerpo o
10 una porción de unión a antígeno de éste (Kabat *et al.* (1971) *Ann. NY Acad. Sci.* 190:382-391, y Kabat, E.A., *et al.* (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest, Quinta Edición*, Departamento de Salud y Servicios Humanos de los EEUU, Publicación del NIH 91-3242). Para la región variable de la cadena pesada, la región hipervariable se extiende entre las posiciones de los aminoácidos 31 a 35 para CDR1, entre las posiciones de los
15 aminoácidos 50 a 65 para CDR2, y entre las posiciones de los aminoácidos 95 a 102 para CDR3. Para la región variable de la cadena liviana, la región hipervariable se extiende entre las posiciones de los aminoácidos 24 a 34 para CDR1, entre las posiciones de los aminoácidos 50 a 56 para CDR2, y entre las posiciones de los aminoácidos 89 a 97 para CDR3.

20 Como se los usa en la presente documentación, los términos "aceptor" y "anticuerpo aceptor" hacen referencia al anticuerpo o la secuencia de ácido nucleico que proporciona o codifica al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 98%, o 100% de las secuencias de aminoácidos de una o más de las regiones de marco. En algunas realizaciones, el término "aceptor" hace referencia a la secuencia de
25 aminoácidos o ácidos nucleicos del anticuerpo que proporciona o codifica las regiones constantes. En aún otra realización, el término "aceptor" hace referencia a la secuencia de aminoácidos o ácidos nucleicos del anticuerpo que proporciona o codifica una o más de las regiones de marco y las regiones constantes. En una realización específica, el término "aceptor" hace referencia a una secuencia de aminoácidos o ácidos nucleicos de un
30 anticuerpo que proporciona o codifica al menos 80%, preferiblemente, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 98%, o 100% de las secuencias de aminoácidos de una o más de las regiones de marco. De acuerdo con esta realización, un aceptor puede contener al menos 1, al menos 2, al menos 3, al menos 4, al menos 5 o al menos 10
35 residuos de aminoácidos que no aparecen en una o más posiciones específicas de un anticuerpo humano. Una región de marco aceptora y/o una región constante aceptora, por ejemplo, puede derivar o puede obtenerse a partir de un anticuerpo de la línea germinal, un gen de un anticuerpo maduro, un anticuerpo funcional (por ejemplo, anticuerpos bien

conocidos en la técnica, anticuerpos en desarrollo, o anticuerpos disponibles comercialmente).

Como se lo usa en la presente documentación, el término "CDR" hace referencia a la región de determinación de la complementariedad dentro de las secuencias variables de un anticuerpo. Para cada una de las regiones variables, hay tres CDR en cada una de las regiones variables de la cadena pesada y la cadena liviana, que se denominan CDR1, CDR2 y CDR3. El término "conjunto de CDR", como se lo usa en la presente documentación, hace referencia a un grupo de tres CDR que aparecen en una sola región variable y permiten la unión al antígeno. Los límites exactos de estas CDR han sido definidos en distintos términos de acuerdo con distintos sistemas. El sistema descripto por Kabat (Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest* (Instituto Nacional de Salud, Bethesda, Md. (1987) y (1991)) no solamente provee un sistema de numeración no ambiguo de los residuos que puede aplicarse a cualquier región variable de un anticuerpo, sino que también provee límites precisos para los residuos que definen las tres CDR. Estas CDR pueden denominarse CDR Kabat. Chotia y sus colegas (Chotia y Lesk, *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987) y Chotia et al., *Nature* 342:877-883 (1989)) descubrieron que determinadas sub-porciones dentro de las CDR Kabat adoptan conformaciones casi idénticas del esqueleto peptídico, a pesar de su gran diversidad a nivel de la secuencia de aminoácidos. Estas sub-porciones se denominaron L1, L2 y L3, o H1, H2 y H3, donde "L" y "H" hacen referencia a las regiones de la cadena liviana y la cadena pesada, respectivamente. Estas regiones pueden denominarse CDR Chotia, y tienen límites que se superponen con las CDR Kabat. Otros límites que definen CDR que se superponen con las CDR de Kabat han sido descriptos por Padlan (*FASEB J.* 9:133-139 (1995)) y MacCallum (*J Mol Biol* 262(5):732-45 (1996)). Aún otras definiciones de límites de CDR pueden no seguir estrictamente uno de los sistemas anteriores, pero aún así se superponen con las CDR Kabat, aunque pueden estar acortadas o alargadas a la luz de las predicciones o los descubrimientos experimentales de residuos o grupos de residuos particular, o aún CDR completas, que no afectan significativamente la unión al antígeno. En los métodos usados en la presente documentación pueden emplearse CDR definidas de acuerdo con cualquiera de estos sistemas, aunque en realizaciones preferidas se usan CDR definidas de acuerdo con Kabat o Chotia.

Como se lo usa en la presente documentación, el término residuo "canónico" hace referencia a un residuo en una CDR o un marco que define una estructura canónica de CDR particular, como lo definen Chotia et al. (*J. Mol. Biol.* 196:901-907 (1987); Chotia et al., *J. Mol. Biol.* 227:799 (1992), ambos incorporados en la presente documentación a modo de referencia). De acuerdo con Chotia et al., las porciones críticas de las CDR de muchos anticuerpos tienen conformaciones del esqueleto peptídico casi idénticas, a pesar

de su gran diversidad a nivel de la secuencia de aminoácidos. Cada estructura canónica especifica principalmente un conjunto de ángulos de torsión del esqueleto peptídico para un segmento contiguo de residuos de aminoácidos que forman un rizo.

5 Como se los usa en la presente documentación, los términos "donante" y "anticuerpo donante" hacen referencia a un anticuerpo que proporciona una o más CDR. En una realización preferida, el anticuerpo donante es un anticuerpo de una especie diferente del anticuerpo del que se obtienen o derivan las regiones de marco. En el contexto de un anticuerpo humanizado, el término "anticuerpo donante" hace referencia a un anticuerpo no humano que proporciona una o más CDR.

10 Como se lo usa en la presente documentación, el término "marco" o "secuencia de marco hace referencia a las secuencias restantes de una región variable menos las CDR. Como la definición exacta de una secuencia CDR puede determinarse usando distintos sistemas, el significado de una secuencia de marco está sujeto a interpretaciones correspondientemente diferentes. Las seis CDR (CDR-L1, L2 y L3 de la cadena liviana, y 15 CDR-H1, H2 y H3 de la cadena pesada) también dividen las regiones de marco en la cadena liviana y la cadena pesada en cuatro sub-regiones (FR1, FR2, FR3 y FR4) en cada cadena, donde CDR1 está localizada entre FR1 y FR2, CDR2 está localizada entre FR2 y FR3, y CDR3 está localizada entre FR3 y FR4. Sin especificar las sub-regiones particulares como FR1, FR2, FR3 o FR4, una región de marco, tal como la han definido 20 otros, representa las FR combinadas en la región variable de una sola cadena de inmunoglobulina de ocurrencia natural. Como se la usa en la presente documentación, una FR representa una de las cuatro sub-regiones, y las FR representan dos o más de las cuatro sub-regiones que constituyen una región de marco.

25 En la técnica se conocen secuencias aceptoras de la cadena pesada y la cadena liviana humanas. En una realización de la invención, las secuencias aceptoras de la cadena pesada y la cadena liviana humanas se seleccionan entre las secuencias que se describen en la tabla 3 y la tabla 4. En dichas tablas se detallan distintas combinaciones de las secuencias de marco humanas FR1 a FR4.

Tabla 3. Secuenciasceptoras de la cadena pesada humana

SE Q ID Nº	Región de la proteína	Secuencia
		12345678901234567890123456789012
15	VH3-48/JH3 FR1	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS
16	VH3-48/JH3 FR2	WVRQAPGKGLEWVS
17	VH3-48/JH3 FR3	RFTISRDNKNSLYLQMNSLRDEDTAVYYCAR
18	VH3-48/JH3 FR4	WGQGTMTVSS
15	VH3-48/JH4 FR1	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS
16	VH3-48/JH4 FR2	WVRQAPGKGLEWVS
17	VH3-48/JH4 FR3	RFTISRDNKNSLYLQMNSLRDEDTAVYYCAR
19	VH3-48/JH4 FR4	WGQGTMTVSS
15	VH3-48/JH6 FR1	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS
16	VH3-48/JH6 FR2	WVRQAPGKGLEWVS
17	VH3-48/JH6 FR3	RFTISRDNKNSLYLQMNSLRDEDTAVYYCAR
20	VH3-48/JH6 FR4	WGQGTMTVSS
21	VH3-33/JH3 FR1	QVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFS
22	VH3-33/JH3 FR2	WVRQAPGKGLEWVA
23	VH3-33/JH3 FR3	RFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR
18	VH3-33/JH3 FR4	WGQGTMTVSS
21	VH3-33/JH4 FR1	QVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFS
22	VH3-33/JH4 FR2	WVRQAPGKGLEWVA
23	VH3-33/JH4 FR3	RFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR
19	VH3-33/JH4 FR4	WGQGTMTVSS

SE Q ID Nº	Región de la proteína	Secuencia
		12345678901234567890123456789012
21	VH3-33/JH6 FR1	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFT FS
22	VH3-33/JH6 FR2	WVRQAPGKGLEWVA
23	VH3-33/JH6 FR3	RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYY CAR
20	VH3-33/JH6 FR4	WGQGTTVTVSS
24	VH3-23/JH3 FR1	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTF S
25	VH3-23/JH3 FR2	WVRQAPGKGLEWVS
26	VH3-23/JH3 FR3	RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYY CAK
18	VH3-23/JH3 FR4	WGQGTMTVTVSS
24	VH3-23/JH4 FR1	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTF S
25	VH3-23/JH4 FR2	WVRQAPGKGLEWVS
26	VH3-23/JH4 FR3	RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYY CAK
19	VH3-23/JH4 FR4	WGQGT LVTVSS
24	VH3-23/JH6 FR1	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTF S
25	VH3-23/JH6 FR2	WVRQAPGKGLEWVS
26	VH3-23/JH6 FR3	RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYY CAK
20	VH3-23/JH6 FR4	WGQGTTVTVSS

45

Tabla 4. Secuenciasceptoras de la cadena liviana humana

SE Q ID Nº	Región de la proteína	Secuencia
		12345678901234567890123456789012
27	A18/JK2 FR1	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISC
28	A18/JK2 FR2	WYLQKPGQSPQLLIY
29	A18/JK2 FR3	GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAED VGVYYC
30	A18/JK2 FR4	FGQGTKLEIKR
31	A17/JK2 FR1	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISC
32	A17/JK2 FR2	WFQQRPGQSPRRLIY
33	A17/JK2 FR3	GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAED VGVYYC
30	A17/JK2 FR4	FGQGTKLEIKR

5 Como se lo usa en la presente documentación, el término “gen de anticuerpo de la
línea germinal” o “fragmento de gen” hace referencia a una secuencia de inmunoglobulina
codificada por células no linfoides que no han pasado por el proceso de maduración que
resulta en la redistribución genética y la mutación, cuyo fin es la expresión de una
inmunoglobulina particular (véanse, por ejemplo, Shapiro et al., Crit. Rev. Immunol. 22(3):
183-200 (2002); Marchalonis et al., Adv Exp Med Biol. 484:13-30 (2001)). Una de las
ventajas proporcionadas por las diversas realizaciones de la presente invención deriva del
10 descubrimiento de que los genes de anticuerpos de la línea germinal tienen mayores
probabilidades que los genes de genes maduros de conservar estructuras esenciales en
su secuencia de aminoácidos que son propias de los individuos de la especie, por lo que
es menos probable sean reconocidos como extraños cuando se los use con fines
terapéuticos en dicha especie.

15 Como se lo usa en la presente documentación, el término residuos “clave” hace
referencia a determinados residuos dentro de la región variable que tienen un impacto
mayor sobre la especificidad y/o la afinidad de unión de un anticuerpo, en particular, un
anticuerpo humanizado. Un residuo clave incluye, no taxativamente, uno o más de los
siguientes: un residuo que se halla adyacente a una CDR, un sitio de glicosilación
20 potencial (puede ser un sitio de N u O-glicosilación), un residuo raro, un residuo capaz de
interactuar con el antígeno, un residuo capaz de interactuar con una CDR, un residuo
canónico, un residuo de contacto entre la región variable de la cadena pesada y la región

45
5A

variable de la cadena liviana, un residuo en la zona de Vernier, y un residuo en una región donde se superpone una CDR1 de cadena pesada definida por Chotia y un marco de la primera cadena pesada definida por Kabat.

El término "anticuerpo humanizado", en general, hace referencia a anticuerpos que
5 contienen secuencias de la región variable de las cadenas pesada y liviana de una especie no humana (por ejemplo, ratón, rata, conejo, pollo, camélidos, ovejas o cabras), pero donde al menos una parte de la secuencia VH y/o VL ha sido alterada para que sean más "similares a humanos", es decir, para que sean más similares a las secuencias variables de la línea germinal humana. Un tipo de anticuerpo humanizado es un
10 anticuerpo con una CDR injertada donde las secuencias CDR humanas han sido insertadas en secuencias VH y VL no humanas para reemplazar las secuencias CDR no humanas correspondientes.

En particular, como se lo usa en la presente documentación, el término "anticuerpo humanizado" hace referencia específicamente a un anticuerpo, o una variante, un
15 derivado, un análogo o un fragmento de éste, que se une de forma inmuno-específica a un antígeno de interés, y que comprende una región de marco (FR) que sustancialmente tiene la secuencia de aminoácidos de un anticuerpo humano y una región de determinación de la complementariedad (CDR) que sustancialmente tiene la secuencia de aminoácidos de un anticuerpo no humano. Como se lo usa en la presente documentación,
20 el término "sustancialmente", en el contexto de una CDR, hace referencia a una CDR que tiene una secuencia de aminoácidos al menos 50, 55, 60, 65, 70, 75 u 80%, preferiblemente al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 98% o al menos 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de la CDR de un anticuerpo no humano. Un anticuerpo humanizado sustancialmente comprende la totalidad de al menos uno, y
25 típicamente dos dominios variables (Fab, Fab', F(ab')₂, FabC, Fv), donde la totalidad o sustancialmente todas las regiones de CDR corresponden a aquellas de una inmunoglobulina no humana (es decir, el anticuerpo donante), y la totalidad o sustancialmente todas las regiones de marco son las de una secuencia consenso de inmunoglobulina humana. Preferiblemente, un anticuerpo humanizado también comprende
30 al menos una porción de una región constante de inmunoglobulina (Fc), típicamente la de una inmunoglobulina humana. En algunas realizaciones, un anticuerpo humanizado contiene la cadena liviana y al menos el dominio variable de una cadena pesada. El anticuerpo también puede incluir las regiones CH1, bisagra, CH2, CH3 y CH4 de la cadena pesada. En algunas realizaciones, un anticuerpo humanizado solamente contiene
35 una cadena liviana humanizada. En algunas realizaciones, un anticuerpo humanizado solamente contiene una cadena pesada humanizada. En realizaciones específicas, un

anticuerpo humanizado solamente contiene un dominio variable humanizado de una cadena liviana y/o una cadena pesada humanizada.

El anticuerpo humanizado puede seleccionarse entre cualquier clase de inmunoglobulina, incluyendo IgY, IgM, IgG, IgD, IgA e IgE, y cualquier isotipo, incluyendo, no taxativamente, IgA1, IgA2, IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. El anticuerpo humanizado puede comprender secuencias de más de una clase o isotipo, y los dominios constantes particulares pueden seleccionarse con el fin de optimizar las funciones efectoras deseadas usando procedimientos bien conocidos en la técnica.

No es necesario que las regiones de marco y CDR de un anticuerpo humanizado correspondan con precisión a las secuencias progenitoras; por ejemplo, la CDR del anticuerpo donante o el marco consenso puede haber sido mutada mediante la sustitución, la inserción y/o la supresión de al menos un residuo de aminoácido, de modo que el residuo de la CDR o el marco en dicho sitio no corresponde al anticuerpo donante o al marco consenso. Sin embargo, en una realización preferida, estas mutaciones no son extensas. Comúnmente, al menos 50, 55, 60, 65, 70, 75 u 80%, preferiblemente al menos 85%, más preferiblemente, al menos 90%, y más preferiblemente, al menos 95% de los residuos del anticuerpo humanizado corresponderán a los de las secuencias de las FR y CDR progenitoras. Como se lo usa en la presente documentación, el término "marco consenso" hace referencia a la región del marco en la secuencia de la inmunoglobulina consenso. Como se lo usa en la presente documentación, el término "secuencia de inmunoglobulina consenso" hace referencia a la secuencia formada con los aminoácidos de ocurrencia más frecuente (o nucleótidos) en una familia de secuencias de inmunoglobulina relacionadas (véase, por ejemplo, Winnaker, From Genes to Clones (Verlagsgesellschaft, Weinheim, Alemania, 1987). En una familia de inmunoglobulinas, cada posición en la secuencia consenso está ocupada por el aminoácido que aparece con mayor frecuencia en dicha posición en la familia. Cuando dos aminoácidos aparecen con igual frecuencia, cualquiera de ellos puede incluirse en la secuencia consenso.

Como se la usa en la presente documentación, la zona "Vernier" hace referencia a un subconjunto de residuos del marco que pueden ajustar la estructura de la CDR y ajustarla con precisión para que se una al antígeno como, lo describen Foote y Winter (1992, J. Mol. Biol. 224:487-499, que se incorpora en la presente documentación a modo de referencia). Los residuos de la zona Vernier forman una capa que queda debajo de las CDR, y pueden afectar la estructura de las CDR y la afinidad del anticuerpo.

El término "inhibición de la unión" de RGM a uno de sus receptores, como se lo usa en la presente documentación, abarca la reducción parcial (tal como, por ejemplo, de aproximadamente 20%, 40%, 60%, 80%, 85%, 90%, 95%, o más) o completa de dicha actividad de unión al receptor. Dicha "inhibición de la unión" puede determinarse con

cualquier método apropiado disponible en la técnica, preferiblemente con cualquier método mencionado en la presente documentación a modo de ejemplo, tal como los ensayos de unión basados en ELISA.

Como se lo usa en la presente documentación, el término "neutralización" hace referencia a la neutralización de la actividad biológica de una proteína blanco, cuando una proteína de unión se une específicamente a la proteína blanco. La neutralización puede ser el resultado de los distintos modos de unión de dicha proteína con el blanco. Por ejemplo, la neutralización puede ser provocada por la unión de la proteína de unión en una región del blanco que no afecta la unión del receptor a la molécula blanco. Como alternativa, la unión de una proteína de unión puede resultar en un bloqueo de la unión del receptor al blanco, donde este bloqueo finalmente neutraliza la actividad de la proteína blanco. Cada uno de estos mecanismos puede tener lugar de acuerdo con la invención. Preferiblemente, una proteína de unión neutralizadora es un anticuerpo neutralizador, cuya unión a hRGM A resulta en la neutralización de una actividad biológica de hRGM A. Preferiblemente, la proteína de unión neutralizadora se une a hRGM A y reduce una actividad biológica de hRGM A al menos aproximadamente 20%, 40%, 60%, 80%, 85%, o más. La neutralización de una actividad biológica de hRGM A por una proteína de unión neutralizadora puede determinarse midiendo uno o más indicadores de la actividad biológica de hRGM A bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, la neutralización de hRGM A revierte la inhibición en un ensayo de desarrollo neuronal NTera (véase el Ejemplo 3 más adelante). En el ensayo de desarrollo de neuritas NTera se evalúa la inhibición del desarrollo de las neuritas. En ausencia de una proteína RGM A o un fragmento de ésta, y en presencia del sustrato estimulador del desarrollo laminina, los agregados de neuronas NTera presentan una red extensa y densa de neuritas en desarrollo. RGM A o los fragmentos de RGM A inhiben el desarrollo de las neuritas, lo que resulta en neuritas más cortas y en menor cantidad. Los antagonistas que bloquean la función de RGM A, o los anticuerpos monoclonales, tales como el anticuerpo monoclonal 5F9, neutralizan la potente actividad de inhibición del desarrollo de las neuritas del fragmento de la cadena liviana de hRGM A conjugado con fc (aminoácidos 47-168) de la proteína RGM A humana en ensayos de desarrollo de neuritas con agregados de neuronas humanas diferenciadas NTera, lo que resulta en un incremento marcado en la longitud y la cantidad de neuritas.

Un "anticuerpo monoclonal neutralizador", como se lo usa en la presente documentación, hace referencia a una preparación de moléculas de anticuerpos que, al unirse a un antígeno específico, pueden competir e inhibir la unión del ligando natural de dicho antígeno. En una realización particular de esta solicitud, los anticuerpos neutralizadores de la presente invención pueden competir con RGM A por la unión a la

48
54

neogenina y/o BMP-2 y BMP-4, lo que permite prevenir la actividad biológica o la función de RGM A. En particular, los anticuerpos neutralizadores de la presente invención pueden unirse a RGM A y prevenir la unión a la neogenina y/o a BMP2 y/o BMP-4, y pueden prevenir la actividad biológica o la función de RGM A. El término "actividad" incluye actividades tales como la especificidad de unión/afinidad de un anticuerpo por un antígeno, por ejemplo, un anticuerpo anti-hRGM A que se une a un antígeno de RGM A, y/o la potencia de neutralización de un anticuerpo, por ejemplo, un anticuerpo anti-hRGM A, cuya unión a hRGM A inhibe la actividad biológica de hRGM A, por ejemplo, como puede determinarse en un ensayo de unión de hRGM A a neogenina, un ensayo de unión de hRGM A a BMP-2 o un ensayo de unión de hRGM A a BMP-4, como se describirá en la sección experimental más adelante. Puede establecerse que la actividad biológica de RGM A regula la migración celular. Un ejemplo especial de la migración celular es el crecimiento de las neuritas, que se ve impedido o inhibido por las proteínas RGM A. Además, se ha demostrado que las proteínas RGM modulan la actividad de las proteínas BMP. En los ejemplos en la presente documentación se describe por un lado una actividad potenciadora sinérgica de las proteínas RGM sobre la vía de las BMP, y por otro, una actividad de inhibición de las proteínas RGM sobre la vía de las BMP, la cual es importante para la regulación del metabolismo del hierro, la regeneración de huesos y cartílagos, y en el SNC; para la remielinización y la regeneración.

El término "epitope" o "determinante antigénico" incluye cualquier determinante polipeptídico capaz de establecer una unión específica con una inmunoglobulina o un receptor de células T. En determinadas realizaciones, los epitopes determinantes incluyen agrupaciones superficiales de moléculas con actividad química, tales como aminoácidos, cadenas laterales de azúcares, fosforilos o sulfonilos, y en determinadas realizaciones, pueden tener características específicas en su estructura tridimensional y/o características de carga específicas. Un epitope es una región de un antígeno donde se une un anticuerpo. En determinadas realizaciones, se dice que un anticuerpo se une específicamente a un antígeno cuando reconoce de forma preferencial su antígeno blanco en una mezcla compleja de proteínas y/o macromoléculas.

El término "resonancia de plasmón superficial", como se lo usa en la presente documentación, hace referencia a un fenómeno óptico que permite analizar las interacciones bioespecíficas a tiempo real mediante la detección de alteraciones en las concentraciones de proteínas en una matriz biosensora, por ejemplo, usando el sistema BIAcore (Pharmacia Biosensor AB, Uppsala, Suecia, y Piscataway, NJ). Para hallar descripciones adicionales, véanse Jönsson, U., *et al.* (1993) *Ann. Biol. Clin.* 51:19-26; Jönsson, U., *et al.* (1991) *Biotechniques* 11:620-627; Johnsson, B., *et al.* (1995) *J. Mol. Recognit.* 8:125-131; y Johnsson, B., *et al.* (1991) *Anal. Biochem.* 198:268-277.

El término " K_{on} ", como se lo usa en la presente documentación, hace referencia a la constante de velocidad de activación para la asociación de un anticuerpo con el antígeno para formar el complejo de anticuerpo/antígeno, como es conocido en la técnica.

El término " K_{off} ", como se lo usa en la presente documentación, hace referencia a la constante de velocidad de desactivación para la disociación de un anticuerpo del complejo de anticuerpo/antígeno, como es conocido en la técnica.

El término " K_d ", como se lo usa en la presente documentación, hace referencia a la constante de disociación de una interacción anticuerpo-antígeno particular, como es conocido en la técnica.

El término "proteína de unión marcada", como se lo usa en la presente documentación, hace referencia a una proteína con una marca incorporada que permite identificar la proteína de unión. Preferiblemente, la marca es una marca detectable, por ejemplo, la incorporación de un aminoácido radiomarcado o la unión de porciones biotiniladas a un polipéptido, donde dichas porciones pueden ser detectadas por avidina marcada (por ejemplo, estreptavidina que contiene un marcador fluorescente o una actividad enzimática que puede ser detectada por medios métodos ópticos o colorimétricos). Los ejemplos de marcas para polipéptidos incluyen, no taxativamente, los que se indican a continuación: radioisótopos o radionucleidos (por ejemplo, ^3H , ^{14}C , ^{35}S , ^{90}Y , ^{99}Tc , ^{111}In , ^{125}I , ^{131}I , ^{177}Lu , ^{166}Ho o ^{153}Sm); marcas fluorescentes (por ejemplo, FITC, rodamina, lantánidos fosforados), marcas enzimáticas (por ejemplo, peroxidasa de rábano picante, luciferasa, fosfatasa alcalina); marcas quimioluminiscentes; grupos biotínico; epitopes polipeptídicos predeterminados reconocidos por una marca secundaria (por ejemplo, secuencias de pares de cierres de leucina, sitios de unión para anticuerpos secundarios, dominios que se unen a metales, marcas de epitopes); y agentes magnéticos, tales como quelatos de gadolinio.

El término "anticuerpo conjugado" hace referencia a una proteína de unión, tal como un anticuerpo, unida a una segunda porción química, tal como un agente terapéutico o citotóxico. El término "agente" se utiliza en la presente documentación para indicar un compuesto químico, una mezcla de compuestos químicos, una macromolécula biológica o un extracto obtenido a partir de materiales biológicos. Preferiblemente, los agentes terapéuticos o citotóxicos incluyen, no taxativamente, toxinas pertussis, taxol, citocalasina B, gramicidina D, bromuro de etidio, emetina, mitomicina, etopósido, tenopósido, vincristina, vinblastina, colchicina, doxorubicina, daunorrubicina, dihidroxi antracina, mitoxantrona, mitramicina, actinomicina D, 1-dehidrotestosterona, glucocorticoides, procaína, tetracaína, lidocaína, propranolol y puromicina, y análogos u homólogos de éstos.

50
5

Los términos "cristal" y "cristalizado", como se los usa en la presente documentación, hacen referencia a un anticuerpo o una porción de unión a antígeno de éste que existe en forma de un cristal. Los cristales son una forma de materia en estado sólido que es diferente de otras formas, tales como el estado sólido amorfo o el estado líquido cristalino. Los cristales están compuestos por disposiciones de átomos, iones o moléculas tridimensionales, repetitivas y regulares (por ejemplo, proteínas, tales como anticuerpos), o ensamblajes moleculares (por ejemplo, complejos de antígenos/anticuerpos). Estas disposiciones tridimensionales siguen relaciones matemáticas bien comprendidas en el campo. La unidad fundamental, o bloque de construcción, que se repite en un cristal, se denomina unidad asimétrica. La repetición de la unidad asimétrica en una disposición que satisface una simetría cristalográfica dada y bien definida provee la "célula individual" del cristal. La repetición de la célula individual por repeticiones regulares en las tres dimensiones provee el cristal. Véanse Giege, R. y Ducruix, A. Barrett, *Crystallization of Nucleic Acids and Proteins, a Practical Approach*, 2ª edición, pp. 20 1-16, Oxford University Press, Nueva York, Nueva York, (1999).

El término "polinucleótido", como se lo usa en la presente documentación, hace referencia a una forma polimérica de dos o más nucleótidos, ya sean ribonucleótidos o desoxinucleótidos, o una forma modificada de cualquier tipo de nucleótido. El término incluye formas de ADN de cadena simple y doble, pero preferiblemente es ADN de cadena doble.

El término "polinucleótido aislado", como se lo usa en la presente documentación, hace referencia a un polinucleótido (por ejemplo, genómico, basado en ADNc o de origen sintético, o alguna combinación de éstos) que, en virtud de su origen, no está asociado con la totalidad o una porción de un polinucleótido con el que dicho "polinucleótido aislado" se hallaría en la naturaleza, está unido a un polinucleótido con el que no está unido en la naturaleza, o no aparece en la naturaleza como parte de una secuencia mayor.

El término "vector", como se lo usa en la presente documentación, hace referencia a una molécula de ácido nucleico capaz de transportar otro ácido nucleico al que está unido. Un tipo de vector es un "plásmido", que designa un rizo de ADN circular de cadena doble con el que pueden unirse segmentos de ADN adicionales. Otro tipo de vector es un vector viral, que permite unir segmentos de ADN adicionales al genoma viral. Determinados vectores son capaces de replicarse en forma autónoma en la célula huésped en la que han sido introducidos (por ejemplo, los vectores bacterianos con un origen de replicación en bacterias y los vectores episomales de mamíferos). Otros vectores (por ejemplo, vectores no episomales de mamíferos) pueden integrarse en el genoma de una célula huésped al introducirse en ella, por lo que se replican junto con el

genoma del huésped. Más aún, determinados vectores son capaces de dirigir la expresión de los genes con los que están unidos operativamente. Estos vectores se conocen en la presente documentación como "vectores de expresión recombinante" (o simplemente "vectores de expresión"). En general, los vectores de expresión útiles para los procedimientos de ADN recombinante comúnmente toman la forma de plásmidos. En esta solicitud, "plásmido" y "vector" pueden usarse indistintamente, ya que el plásmido es la forma de vector de uso más común. Sin embargo, la invención pretende incluir estas otras formas de vectores de expresión, tales como vectores virales (por ejemplo, retrovirus de replicación defectuosa, adenovirus y virus adeno-asociados), que tienen funciones equivalentes.

El término "unido operativamente" hace referencia a una yuxtaposición donde los componentes descritos se hallan en una relación que les permite funcionar de la manera deseada. Una secuencia control "unida operativamente" a una secuencia codificante está ligada de modo tal que la expresión de la secuencia codificante se obtiene bajo condiciones compatibles con las secuencias control. Las secuencias "unidas operativamente" incluyen secuencias de control de la expresión que se hallan contiguas al gen de interés y secuencias de control de la expresión que actúan en *trans* o a distancia para controlar el gen de interés. El término "secuencia de control de la expresión", como se lo usa en la presente documentación, hace referencia a secuencias de polinucleótidos que son necesarias para obtener la expresión y el procesamiento de las secuencias codificantes a las que están unidas. Las secuencias de control de la expresión incluyen secuencias apropiadas para el inicio de la transcripción, la terminación, secuencias promotoras y potenciadoras; señales eficaces para el procesamiento del ARN, tales como secuencias de separación y poliadenilación; secuencias que estabilizan el ARNm citoplasmático; secuencias que mejoran la eficiencia de la traducción (es decir, la secuencia consenso Kozak); secuencias que mejoran la estabilidad de las proteínas; y cuando se lo desea, secuencias que mejoran la secreción de las proteínas. La naturaleza de estas secuencias de control difiere dependiendo del organismo huésped. En procariotas, estas secuencias de control generalmente incluyen promotores, sitios de unión a ribosomas y secuencias de terminación de la transcripción. En eucariotas, en general, estas secuencias de control incluyen promotores y secuencias de terminación de la transcripción. El término "secuencias de control" incluye componentes cuya presencia es esencial para la expresión y el procesamiento, y también puede incluir componentes adicionales cuya presencia es ventajosa, por ejemplo, secuencias directrices y secuencias que son asociados de fusión.

La "transformación", como se la define en la presente documentación, hace referencia a cualquier proceso con el cual el ADN exógeno ingresa en una célula

huésped. La transformación puede ocurrir bajo condiciones naturales o artificiales, usando diversos métodos bien conocidos en la técnica. La transformación puede basarse en cualquier método conocido para insertar secuencias de ácidos nucleicos extrañas en células huésped procariotas o eucariotas. El método se selecciona sobre la base de la célula huésped a transformar, y puede incluir, no taxativamente, la infección viral, la electroporación, la lipofección y el bombardeo de partículas. Estas células "transformadas" incluyen células transformadas de forma estable, donde el ADN insertado puede replicarse como un plásmido de replicación autónoma o como parte del cromosoma del huésped. También incluyen células que expresan de forma transitoria el ADN o el ARN insertado por períodos de tiempo limitados.

El término "célula huésped recombinante" (o simplemente "célula huésped"), como se lo usa en la presente documentación, hace referencia a la célula en la que se introduce ADN exógeno. Ha de comprenderse que estos términos no solamente hacen referencia a la célula sujeto particular, sino a la progenie de dicha célula. Como es posible que ocurran modificaciones en las generaciones sucesivas debido a mutaciones o influencias ambientales, de hecho, esta progenie puede no ser idéntica a la célula progenitora, pero aún se incluye dentro del término "célula huésped", tal como se lo usa en la presente documentación. Preferiblemente, las células huésped incluyen células procariotas y eucariotas seleccionadas entre cualquiera de los reinos de la vida. Las células eucariotas preferidas incluyen células protistas, fúngicas, vegetales y animales. Más preferiblemente, las células huésped incluyen, no taxativamente, células procariotas de la línea de *E. coli*; las líneas de células de mamíferos CHO, HEK 293 y COS; la línea de células de insecto Sf9; y la célula fúngica *Saccharomyces cerevisiae*.

Pueden emplearse técnicas convencionales para la síntesis de ADN recombinante y oligonucleótidos, y para cultivo y la transformación de tejidos (por ejemplo, electroporación, lipofección). Las reacciones enzimáticas y los procedimientos de purificación pueden llevarse a cabo de acuerdo con las especificaciones de los fabricantes, de maneras conocidas en la técnica o como se describe en la presente documentación. Las técnicas y los procedimientos mencionados en general pueden llevarse a cabo de acuerdo con métodos convencionales bien conocidos en la técnica, y como se describe en diversas referencias generales y más específicas que se citan y se describen en toda la presente memoria descriptiva. Véase, por ejemplo, Sambrook et al. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2ª edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989)), cuyo contenido se incorpora en la presente documentación a modo de referencia para cualquier propósito.

Un "organismo transgénico", como es conocido en la técnica y como se lo usa en la presente documentación, hace referencia a un organismo que tiene células que

contienen un transgen, donde el transgen introducido en el organismo (o cualquier ancestro del organismo) expresa un polipéptido que no se expresa naturalmente en el organismo. Un "transgen" es una construcción de ADN que se integra de forma estable y operativa en el genoma de una célula a partir de la que se desarrolla un organismo transgénico, donde dirige la expresión de un producto génico codificado en uno o más tipos celulares o tejidos del organismo transgénico.

Los términos "regular" y "módular" se usan indistintamente, y como se los emplea en la presente documentación, hacen referencia a un cambio o una alteración en la actividad de una molécula de interés (por ejemplo, la actividad biológica de hRGM A). La modulación puede ser un incremento o una disminución en la magnitud de una actividad o una función determinada de la molécula de interés. Los ejemplos de actividades y funciones de una molécula incluyen, no taxativamente, características de unión, actividad enzimática, activación de receptores celulares y transducción de señales.

Correspondientemente, el término "modulador", como se lo usa en la presente documentación, hace referencia a un compuesto capaz de cambiar o alterar una actividad o una función de una molécula de interés (por ejemplo, la actividad biológica de hRGM A). Por ejemplo, un modulador puede provocar un incremento o una disminución en la magnitud de una actividad o una función determinada de una molécula, en comparación con la magnitud de la actividad o la función observada en ausencia del modulador. En algunas realizaciones, un modulador es un inhibidor que disminuye la magnitud de al menos una actividad o función de una molécula. El término "agonista", como se lo usa en la presente documentación, hace referencia a un modulador que, cuando se pone en contacto con una molécula de interés, provoca un incremento en la magnitud de una actividad o una función determinada, en comparación con la magnitud de la actividad o la función observada en ausencia del agonista. Los agonistas particulares de interés pueden incluir, no taxativamente, polipéptidos de hRGM A, o proteínas, ácidos nucleicos, hidratos de carbono o cualquier otra molécula que se una a hRGM A. El término "antagonista", como se lo usa en la presente documentación, hace referencia a un modulador que, cuando se pone en contacto con una molécula de interés, provoca una disminución en la magnitud de una actividad o una función determinada de la molécula, en comparación con la magnitud de la actividad o la función que se observa en ausencia del antagonista. Los ejemplos de antagonistas incluyen, no taxativamente, proteínas, péptidos, anticuerpos, peptidocuerpos, hidratos de carbono o pequeñas moléculas orgánicas, los peptidocuerpos se describen, por ejemplo, en WO 01/83525. Los antagonistas de interés particulares incluyen aquellos que bloquean o modulan la actividad biológica o inmunológica de hRGM A. Los antagonistas de hRGM A pueden incluir, no taxativamente, proteínas, ácidos nucleicos, hidratos de carbono, o cualquier otra molécula que se una a hRGM A, como los

anticuerpos monoclonales que interactúan con la molécula RGM A. Vale destacar que la interacción con RGM A puede resultar en la unión y la neutralización de otros ligandos/componentes de la membrana célula, y puede ser útil para obtener un funcionamiento aditivo o sinérgico contra varias enfermedades.

5 Como se lo usa en la presente documentación, el término "cantidad eficaz" hace referencia a la cantidad de una terapia que es suficiente para reducir o mejorar la severidad y/o la duración de un trastorno o uno o más de sus síntomas, prevenir el avance de un trastorno, provocar la regresión de un trastorno, prevenir la recurrencia, el desarrollo, el inicio o la progresión de uno o más síntomas asociados con un trastorno,
10 detectar un trastorno, o potenciar o mejorar el o los efectos profilácticos o terapéuticos de otra terapia (por ejemplo, un agente profiláctico o terapéutico).

El término "muestra", como se lo usa en la presente documentación, se usa en su sentido más amplio. Una "muestra biológica", como se la usa en la presente documentación, incluye, no taxativamente, una cantidad de una sustancia de un
15 organismo vivo o un organismo que estuvo vivo. Estos organismos vivos incluyen, no taxativamente, seres humanos, ratones, ratas, monos, perros, conejos y otros animales. Estas sustancias incluyen, no taxativamente, sangre, suero, orina, fluido sinovial, células, órganos, tejidos, médula ósea, nódulos linfáticos y bazo.

2. Polipéptidos que se unen a hRGM A

20 La realización principal de esta solicitud comprende proteínas o polipéptidos aislados que se unen específicamente a al menos un epítopo de una proteína RGM A. Las proteínas o los polipéptidos aislados que se unen específicamente a al menos un epítopo de una proteína RGM A pueden inhibir la unión de RGM A a su receptor, la neogenina, y/o a las proteínas morfogenética óseas 2 y 4 (BMP-2, BMP-4).

25 La realización más preferida de esta solicitud comprende anticuerpos que se unen a RGM A y/o BMP-2 y/o BMP-4, o porciones de unión a antígeno o fragmentos de éstos.

Preferiblemente, los anticuerpos anti-RGM A de la presente invención presentan una capacidad elevada de reducir o neutralizar la actividad de RGM A, lo que puede evaluarse, por ejemplo, con cualquiera de los diversos ensayos in vitro e in vivo conocidos
30 en la técnica o descriptos en la presente documentación.

Más preferiblemente, esta solicitud se relaciona con anticuerpos monoclonales neutralizadores contra RGM A que previenen selectivamente la unión de RGM A a su receptor, la neogenina, y a las proteínas morfogenéticas óseas 2 y 4 (BMP-2, BMP-4), y con la generación de un anticuerpo monoclonal neutralizador contra RGM A que
35 previenen selectivamente la unión de RGM A a sus correceptores, las proteínas morfogenéticas óseas 2 y 4 (BMP-2, BMP-4).

55

Preferiblemente, el anticuerpo monoclonal neutralizador de esta solicitud es un anticuerpo humano o un anticuerpo humanizado. El término "anticuerpo humano" hace referencia a anticuerpos que tienen regiones variables y constantes que corresponden o derivan de secuencias de inmunoglobulinas de la línea germinal humana (por ejemplo, véase Kabat et al. *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, quinta edición, Departamento de Salud y Servicios Humanos de los EEUU, Publicación del NIH N° 91-3242, 1991). Los anticuerpos humanos de esta solicitud, sin embargo, pueden incluir residuos de aminoácidos no codificados por secuencias de inmunoglobulinas de la línea germinal humana (por ejemplo, mutaciones que han sido introducidas por mutagénesis al azar o con especificidad de sitio in vitro, o por mutaciones somáticas in vivo), por ejemplo, en las CDR, y en particular, en CDR3.

En diversas realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo recombinante o un anticuerpo monoclonal. Los anticuerpos neutralizadores más preferidos de esta solicitud se mencionan en la presente documentación como mAb5F9 y mAb8D1, y los fragmentos de éstos que son anticuerpos funcionales; al igual que otros anticuerpos y fragmentos que son anticuerpos funcionales y presentan propiedades equivalentes a las de mAb5F9 y mAb8D1, tales como la afinidad de unión elevada por RGM A, con una cinética de disociación baja y una capacidad de neutralización alta, también forman parte de la presente invención. La afinidad de unión y la constante de disociación de un anticuerpo anti-RGM A de esta solicitud con relación a un polipéptido inmunogénico RGM A, o un fragmento de éste, pueden determinarse con cualquier método conocido en la técnica. Por ejemplo, la afinidad de unión puede medirse con ELISA competitivos, radioinmunoensayos, tecnología BIAcore o KinExA. La velocidad de disociación también puede medirse con tecnología BIAcore o KinExA. La afinidad de unión y la velocidad de disociación pueden medirse por resonancia de plasmón superficial, usando, por ejemplo, un dispositivo BIAcore.

Uno de los anticuerpos monoclonales preferidos de esta solicitud, el anticuerpo mAb5F9, tiene al menos 90% de identidad de secuencia a nivel de los aminoácidos con una secuencia que comprende una región variable de la cadena pesada (región VH) que comprende la secuencia de SEQ ID N° 9 ó 34, y una región variable de la cadena liviana (región VL) que comprende la secuencia de SEQ ID N° 10.

Los anticuerpos monoclonales aislados que interactúan con RGM A de esta solicitud también pueden ser una proteína de unión glicosilada, donde el anticuerpo o la porción de unión a antígeno de éste comprende uno o más residuos de hidratos de carbono. La producción nativa de proteínas *in vivo* puede incluir un procesamiento adicional, conocido como modificación postraducciona. En particular, pueden agregarse residuos de azúcares (glicosilo) en forma enzimática, un proceso conocido como

glicosilación. Las proteínas resultantes, que contienen cadenas laterales de oligosacáridos unidas en forma covalente, son conocidas como proteínas glicosiladas o glicoproteínas. La glicosilación de las proteínas depende de la secuencia de aminoácidos de la proteína de interés, así como de la célula huésped en la cual se expresa la proteína.

- 5 Distintos organismos pueden producir enzimas de glicosilación diferentes (por ejemplo, glicosiltransferasas y glicosidasas), y pueden tener diferentes sustratos (azúcares nucleotídicos) disponibles. Debido a dichos factores, el patrón de glicosilación, y la composición de residuos glicosídicos, pueden diferir dependiendo del sistema huésped en el cual se expresa la proteína en particular. Entre los residuos glicosídicos útiles en la
- 10 invención pueden incluirse, no taxativamente, glucosa, galactosa, manosa, fucosa, n-acetilglucosamina y ácido síalico. Preferiblemente, la proteína de unión glicosilada comprende residuos glicosídicos que permiten obtener un patrón de glicosilación humano.

- Los anticuerpos de esta solicitud comprenden una región constante de la cadena pesada, tal como una región constante de IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgE, IgM, IgY o
- 15 IgD. Aún más, el anticuerpo puede comprender una región constante de la cadena liviana, una región constante de la cadena liviana kappa o una región constante de la cadena liviana lambda. Preferiblemente, el anticuerpo comprende una región constante de la cadena liviana kappa. Como alternativa, la porción de anticuerpo puede ser, por ejemplo, un fragmento Fab o un fragmento Fv de cadena simple. Los reemplazos de residuos de
- 20 aminoácidos en la porción Fc para alterar la función efectora del anticuerpo son conocidos en la técnica (Winter, *et al.* Patentes de los EEUU N° 5648260, 5624821) La porción Fc de un anticuerpo es mediadora de diferentes funciones efectoras importantes, por ejemplo, la inducción de citoquinas, la ADCC, la fagocitosis, la citotoxicidad mediada por complemento (CDC), y la velocidad de eliminación/vida media de los anticuerpos y los
- 25 complejos antígeno-anticuerpo. En algunos casos, estas funciones efectoras son deseables para anticuerpos terapéuticos, pero en otros casos, pueden ser innecesarias o incluso perjudiciales, dependiendo de los objetivos terapéuticos. Determinados isotipos de la IgG humana, en particular IgG1 e IgG3, son mediadores de la ADCC y la CDC a través de la unión a FcγRs y al complemento C1q, respectivamente. Los receptores Fc
- 30 neonatales (FcRn) son componentes críticos en la determinación de la vida media en circulación de los anticuerpos. En aún otra realización, al menos un residuo de aminoácido es reemplazado en la región constante del anticuerpo, por ejemplo, la región Fc del anticuerpo, de manera que estas funciones efectoras del anticuerpo resultan alteradas.

35 **3. Generación de anticuerpos anti-hRGM A**

3.1. General

Los anticuerpos de esta solicitud pueden generarse inmunizando un huésped apropiado (por ejemplo, vertebrados, incluyendo seres humanos, ratones, ratas, ovejas, cabras, cerdos, ganado bovino, caballos, peces y anfibios, y huevos de aves, reptiles y peces). Para generar los anticuerpos de esta solicitud, se inmuniza el huésped con un polipéptido inmunogénico de RGM A de la invención, o un fragmento de éste. En la presente documentación, el término "inmunización" hace referencia al proceso que comprende la presentación de un antígeno a un repertorio inmune, el cual puede existir en un organismo natural, sin alteraciones genéticas, o puede provenir de un organismo transgénico, incluyendo aquellos modificados para que presenten un repertorio inmune humano artificial. De manera similar, una "preparación inmunogénica" es una formulación de antígeno que contiene coadyuvantes u otros aditivos que potenciarán la inmunogenicidad del antígeno.

La inmunización de los animales puede efectuarse con cualquier método conocido en la técnica. Véase, por ejemplo, Harlow y Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Nueva York: Cold Spring Harbor Press, 1990. En la técnica se conocen métodos para inmunizar animales no humanos, tales como ratones, ratas, ovejas, cabras, ganado bovino y caballos. Véanse, por ejemplo, Harlow y Lane, y la Patente de los EEUU N° 5994619. En una realización preferida, el antígeno de RGM A se administra con un coadyuvante para estimular la respuesta inmune. Estos coadyuvantes incluyen el coadyuvante completo o incompleto de Freund, RIBI (muramil dipéptidos) o ISCOM (complejos de inmunocoloración). Estos coadyuvantes pueden proteger el polipéptido de una dispersión rápida secuestrándolo en un depósito local, o pueden contener sustancias que estimulan al huésped para que secrete factores quimiotácticos para los macrófagos y otros componentes del sistema inmune. Preferiblemente, si se administra un polipéptido, el cronograma de inmunización comprenderá dos o más administraciones del polipéptido, distribuidas en un período de varias semanas.

Se contempla la posibilidad de inmunizar el animal huésped con el antígeno asociado con la membrana de una célula intacta o destruida, con el fin de identificar los anticuerpos de esta solicitud mediante la unión a un polipéptido inmunogénico de la invención. Una vez realizada la inmunización del animal huésped con el antígeno, es posible obtener anticuerpos del animal. Se obtiene suero que contiene anticuerpos del animal por exsanguinación o sacrificando el animal. El suero puede usarse tal como se lo obtiene del animal, puede obtenerse una fracción de inmunoglobulina del suero, o los anticuerpos pueden purificarse a partir del suero. El suero o las inmunoglobulinas obtenidas de este modo son policlonales, por lo que tienen una serie heterogénea de propiedades.

SB
A

3.2. Anticuerpos monoclonales anti-RGM A obtenidos usando tecnología de hibridomas

Los anticuerpos monoclonales pueden prepararse usando una amplia variedad de procedimientos conocidos en la técnica, que incluyen el uso de tecnologías de hibridoma, recombinantes y de presentación en fagos, o una combinación de éstas. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales pueden producirse usando técnicas que comprenden hibridoma, incluyendo aquellas conocidas en la técnica y descritas, por ejemplo, en Harlow et al., *Antibodies: A Laboratory Manual*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2ª edición, 1988); Hammerling, et al., en *Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas* 563-681 (Elsevier, N.Y., 1981) (estas referencias se incorporan a modo de referencia en su totalidad). El término "anticuerpo monoclonal", como se lo usa en la presente documentación, no se limita a los anticuerpos producidos con tecnología de hibridomas. El término "anticuerpo monoclonal" hace referencia a un anticuerpo que deriva de un clon individual, que incluye cualquier clon eucariota, procariota o de fago, y no el método con el que se lo produce.

Los métodos para producir y buscar anticuerpos específicos usando tecnología de hibridomas son de uso común y bien conocidos en la técnica. En una realización, en la presente invención se proveen métodos para generar anticuerpos monoclonales, y también anticuerpos producidos con el método que comprende cultivar una célula de hibridoma que secreta un anticuerpo de la invención, donde preferiblemente, el hibridoma se genera fusionando esplenocitos aislados de un ratón inmunizado con un antígeno de la invención con células de mieloma, y luego analizando los hibridomas que resultan de la fusión para hallar los clones de hibridomas que secretan un anticuerpo capaz de unirse a un polipéptido de la invención. Brevemente, es posible inmunizar ratones con un antígeno de RGM A. En una realización preferida, el antígeno de RGM A se administra con un coadyuvante para estimular la respuesta inmune. Estos coadyuvantes incluyen el coadyuvante completo o incompleto de Freund, RIBI (muramil dipéptidos) o ISCOM (complejos de inmunocoloración). Estos coadyuvantes pueden proteger el polipéptido de una dispersión rápida secuestrándolo en un depósito local, o pueden contener sustancias que estimulan al huésped para que secrete factores quimiotácticos para los macrófagos y otros componentes del sistema inmune. Preferiblemente, si se administra un polipéptido, el cronograma de inmunización comprenderá dos o más administraciones del polipéptido, distribuidas en un período de varias semanas.

Una vez que se detecta una respuesta inmune, por ejemplo, una vez que se detectan los anticuerpos específicos para el antígeno de RGM A en el suero del ratón, se cosecha el bazo del ratón y se aíslan esplenocitos. Después, los esplenocitos se fusionan de acuerdo con procedimientos bien conocidos a cualquier célula de mieloma apropiada,

por ejemplo, células de la línea celular SP20, disponible en la ATCC. Los hibridomas se seleccionan y se clonan por dilución limitada. Después, los clones de hibridomas se evalúan con métodos conocidos en la técnica para determinar si hay células que secreten anticuerpos capaces de unirse a RGM A. Es posible generar fluido de ascites, que
5 generalmente contiene niveles elevados de anticuerpos, inmunizando los ratones con clones de hibridomas positivos.

En otra realización, los hibridomas inmortalizados productores de anticuerpos pueden prepararse a partir del animal inmunizado. Después de la inmunización, el animal se sacrifica y las células B de bazo se fusionan a células de mieloma inmortalizadas,
10 como es bien conocido en la técnica. Véase, por ejemplo, Harlow y Lane, *supra*. En una realización preferida, las células de mieloma no secretan polipéptidos de inmunoglobulina (una línea de células no secretoras). Una vez completada la fusión y la selección con antibióticos, los hibridomas se analizan usando RGM A o una porción de ésta, o una célula que expresa RGM A. En una realización preferida, el análisis inicial se realiza
15 usando un inmunoensayo ligado a enzimas (ELISA) o un radioinmunoensayo (RIA), preferiblemente un ELISA. Se proporciona un ejemplo de análisis ELISA en WO 00/37504, incorporada en la presente documentación a modo de referencia.

Los hibridomas productores de anticuerpos anti-RGM A se seleccionan, se clonan y se someten a un análisis adicional para determinar la presencia características deseables, incluyendo un crecimiento robusto del hibridoma, una producción elevada de anticuerpos, y la presencia de características deseables en dichos anticuerpos, como se describirá con mayor detalle más adelante. Los hibridomas pueden cultivarse y expandirse *in vivo* en animales singeneicos, en animales que carecen de sistema inmune, por ejemplo, ratones desnudos, o en un cultivo celular *in vitro*. Los métodos para
20 seleccionar, clonar y expandir hibridomas son bien conocidos por aquellos entrenados en la técnica.

En una realización preferida, los hibridomas son hibridomas de ratón, como se describió con anterioridad. En otra realización preferida, los hibridomas se producen en un animal no humano, en una especie distinta del ratón, tal como la rata, la oveja, el cerdo, el
30 ganado bovino o el caballo. En otra realización, los hibridomas son hibridomas humanos, donde un mieloma no secretor humano se fusiona con una célula humana que expresa un anticuerpo anti-RGM A.

Los fragmentos de anticuerpos que reconocen epitopes específicos pueden generarse de acuerdo con técnicas conocidas. Por ejemplo, los fragmentos Fab y F(ab')₂
35 de la invención pueden producirse mediante el corte proteolítico de moléculas de inmunoglobulina, usando enzimas tales como papaína (para producir fragmentos Fab) o

pepsina (para producir fragmentos F(ab')₂). Los fragmentos F(ab')₂ contienen la región variable, la región constante de la cadena liviana y el dominio CHI de la cadena pesada.

3.3. Anticuerpos monoclonales anti-RGM A obtenidos usando SLAM

En otro aspecto de la invención, se generan anticuerpos recombinantes a partir de
5 linfocitos individuales aislados usando un procedimiento conocido en la técnica como el
método de anticuerpos con linfocitos seleccionados (SLAM), como se describe en la
Patente de los EEUU N° 5627052, la Publicación PCT WO 92/02551, y Babcock, J.S. *et*
al. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:7843-7848. En este método, se analizan células
individuales que secretan anticuerpos de interés, por ejemplo, linfocitos derivados de
10 cualquiera de los animales inmunizados descritos con anterioridad, usando un ensayo en
placas hemolíticas con especificidad por el antígeno, donde el antígeno de RGM A, una
subunidad de RGM A o un fragmento de ésta, se une a eritrocitos de oveja usando un
conector, tal como biotina, y se usa para identificar células individuales que secretan
anticuerpos con especificidad por RGM A. Una vez identificadas las células que secretan
15 los anticuerpos de interés, se rescatan moléculas de ADNc de las regiones variables de
las cadenas pesada y liviana de las células por PCR con transcriptasa inversa, y estas
regiones variables pueden expresarse posteriormente en el contexto de regiones
constantes de inmunoglobulina apropiadas (por ejemplo, regiones constantes humanas),
en células huésped de mamíferos, tales como células COS o CHO. Las células huésped
20 transfectadas con las secuencias de inmunoglobulina amplificadas, derivadas de linfocitos
seleccionados *in vivo*, pueden someterse a análisis adicionales y a una selección
posterior *in vitro*, por ejemplo, analizando las células transfectadas para aislar aquellas
células que expresen anticuerpos contra RGM A. Además, las secuencias de
inmunoglobulina amplificadas pueden manipularse *in vitro*, tal como con métodos de
25 maduración por afinidad *in vitro* como los que se describen en la Publicación PCT WO
97/29131 y la Publicación PCT WO 00/56772.

3.4. Anticuerpos monoclonales anti-RGM A obtenidos usando animales transgénicos

En otra realización de la presente invención, los anticuerpos se producen
30 inmunizando un animal no humano que comprende algunos o todos los loci de la
inmunoglobulina humana con un antígeno de RGM A. En una realización preferida, el
animal no humano es un ratón transgénico XENOMOUSE, una cepa de ratón modificada
que comprende fragmentos grandes de loci de inmunoglobulina humana y presenta una
producción de anticuerpos diferentes. Véanse, por ejemplo, Green et al. *Nature Genetics*
35 7:13-21 (1994), y las Patentes de los EEUU N° 5916771, 5939598, 5985615, 5998209,
6075181, 6091001, 6114598 y 6130364. Véanse también WO 91/10741, publicada el 25
de Julio de 1991, WO 94/02602, publicada el 3 de Febrero de 1994, WO 96/34096 y WO

96/33735, ambas publicadas el 31 de Octubre de 1996, WO 98/16654, publicada el 23 de Abril de 1998, WO 98/24893, publicada el 11 de Junio de 1998, WO 98/50433, publicada el 12 de Noviembre de 1998, WO 99/45031, publicada el 10 de Septiembre de 1999, WO 99/53049, publicada el 21 de Octubre de 1999, WO 00/09560, publicada el 24 de Febrero de 2000, y WO 00/037504, publicada el 29 de Junio de 2000. El ratón transgénico XENOMOUSE produce un repertorio de anticuerpos completamente humanos similar al de un ser humano adulto y genera anticuerpos monoclonales humanos con especificidad por el antígeno. El ratón transgénico XENOMOUSE contiene aproximadamente 80% del repertorio humano merced a la introducción de fragmentos YAC con la configuración de la línea germinal humana, con un tamaño en el orden de las megabases, que contienen loci de la cadena pesada humana y loci de la cadena liviana humana. Véanse Mendez et al., *Nature Genetics* 15:146-156 (1997), Green y Jakobovits *J. Exp. Med.* 188:483-495 (1998), cuyas descripciones se incorporan en la presente documentación a modo de referencia.

3.5. Anticuerpos monoclonales anti-RGM A obtenidos usando bibliotecas de anticuerpos recombinantes

También pueden usarse métodos *in vitro* para preparar los anticuerpos de la invención, donde se analiza una biblioteca de anticuerpos para identificar un anticuerpo que tiene la especificidad de unión deseada. Los métodos para analizar bibliotecas de anticuerpos recombinantes son bien conocidos en la técnica, e incluyen los métodos que se describen, por ejemplo, en Ladner et al. Patente de los EEUU N° 5223409; Kang et al. Publicación PCT N° WO 92/18619; Dower et al. Publicación PCT N° WO 91/17271; Winter et al. Publicación PCT N° WO 92/20791; Markland et al. Publicación PCT N° WO 92/15679; Breitling et al. Publicación PCT N° WO 93/01288; McCafferty et al. Publicación PCT N° WO 92/01047; Garrard et al. Publicación PCT N° WO 92/09690; Fuchs et al. (1991) *Bio/Technology* 9:1370-1372; Hay et al. (1992) *Hum Antibod Hybridomas* 3:81-85; Huse et al. (1989) *Science* 246:1275-1281; McCafferty et al., *Nature* (1990) 348:552-554; Griffiths et al. (1993) *EMBO J* 12:725-734; Hawkins et al. (1992) *J Mol Biol* 226:889-896; Clackson et al. (1991) *Nature* 352:624-628; Gram et al. (1992) *PNAS* 89:3576-3580; Garrad et al. (1991) *Bio/Technology* 9:1373-1377; Hoogenboom et al. (1991) *Nuc Acid Res* 19:4133-4137; y Barbas et al. (1991) *PNAS* 88:7978-7982, la publicación de solicitud de patente de los EEUU 20030186374, y la Publicación PCT N° WO 97/29131, cuyos contenidos se incorporan en la presente documentación a modo de referencia.

La biblioteca de anticuerpos recombinantes puede provenir de un sujeto inmunizado con RGM A, o con una porción de RGM A. Como alternativa, la biblioteca de anticuerpos recombinantes puede provenir de un sujeto sin tratar, es decir, uno que no ha sido inmunizado con RGM A, tal como una biblioteca de anticuerpos humanos de un sujeto humano que no ha sido inmunizado con RGM A humana. Los anticuerpos de la

invención se seleccionan analizando la biblioteca de anticuerpos recombinantes con el péptido que comprende RGM A humana, con el fin de seleccionar aquellos anticuerpos que reconocen RGM A. Los métodos para efectuar estos procedimientos de análisis y selección son bien conocidos en la técnica, y pueden hallarse en las referencias citadas en el párrafo anterior. Para seleccionar los anticuerpos de la invención que tienen afinidades de unión particulares por hRGM A, tales como aquellos que se disocian de RGM A humana con una constante de desactivación particular, puede usarse el método conocido en la técnica de resonancia de plasmón superficial para seleccionar los anticuerpos que tienen la constante de desactivación deseada. Para seleccionar los anticuerpos de la invención que tienen una actividad de neutralización de hRGM A particular, tales como aquellos que presentan una IC_{50} particular, pueden usarse métodos convencionales conocidos en la técnica para determinar la inhibición de la actividad de hRGM A.

En un aspecto, la invención se relaciona con un anticuerpo aislado, o con una porción de unión a antígeno de éste que se une a RGM A humana. Preferiblemente, el anticuerpo es un anticuerpo neutralizador. En diversas realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo recombinante o un anticuerpo monoclonal.

Por ejemplo, los anticuerpos de la presente invención también pueden generarse usando diversos métodos de presentación en fagos conocidos en la técnica. En los métodos de presentación en fagos, se presentan dominios de anticuerpos funcionales en la superficie de partículas de fagos que contienen las secuencias de polinucleótidos que los codifican. En particular, estos fagos pueden utilizarse para presentar dominios de unión a antígeno expresados a partir de un repertorio o una biblioteca de combinación de anticuerpos (por ejemplo, humanos o murinos). Los fagos que expresan un dominio de unión a antígeno que se une al antígeno de interés pueden seleccionarse o identificarse con un antígeno, por ejemplo, usando un antígeno marcado o un antígeno unido o capturado en una superficie sólida o una esfera. Los fagos usados en estos métodos típicamente son fagos filamentosos, e incluyen los dominios de unión fd y M13, expresados a partir de fagos con Fab, Fv o dominios de anticuerpos Fv estabilizados por enlaces disulfuro fusionados en forma recombinante al gen III o al gen VIII de proteínas del fago. Los ejemplos de métodos de presentación en fagos que pueden usarse para preparar los anticuerpos de la presente invención incluyen aquellos descritos en Brinkman et al., *J. Immunol. Methods* 182:41-50 (1995); Ames et al., *J. Immunol. Métodos* 184:177-186 (1995); Kettleborough et al., *Eur. J. Immunol.* 24:952-958 (1994); Persic et al., *Gene* 187 9-18 (1997); Burton et al., *Advances in Immunology* 57:191-280 (1994); la Solicitud PCT N°. PCT/GB91/01134; las Publicaciones PCT WO 90/02809, WO 91/10737, WO 92/01047, WO 92/18619, WO 93/11236, WO 95/15982, WO 95/20401; y las Patentes

de los EEUU Nº 5698426, 5223409, 5403484, 5580717, 5427908, 5750753, 5821047, 5571698, 5427908, 5516637, 5780 225, 5658727, 5733743 y 5969108, cada uno de los cuales se incorpora en la presente documentación a modo de referencia en su totalidad.

5 Como se describe en las referencias anteriores, una vez seleccionados los fagos, las regiones codificantes del anticuerpo obtenidas de los fagos pueden aislarse y usarse para generar anticuerpos completos, incluyendo anticuerpos humanos o cualquier otro fragmento de unión a antígeno deseado, y pueden expresarse en cualquier huésped deseado, incluyendo células de mamíferos, células de insectos, células vegetales, levaduras y bacterias, por ejemplo, como se describirá con mayor detalle más adelante.

10 Por ejemplo, también pueden emplearse procedimientos para la producción recombinante de fragmentos Fab, Fab' y F(ab')₂ donde se usan métodos conocidos en la técnica, tales como los que se describen en la Publicación PCT WO 92/22324; Mullinax et al., *BioTechniques* 12(6):864-869 (1992); Sawai et al., *AJRI* 34:26-34 (1995); y Better et al., *Science* 240:1041-1043 (1988) (dichas referencias se incorporan a modo de referencia en su totalidad). Los ejemplos de procedimientos que pueden usarse para producir Fv de

15 cadenas individuales y anticuerpos incluyen aquellos que se describen en las Patentes de los EEUU Nº 4946778 y 5258498; Huston et al., *Métodos in Enzymology* 203:46-88 (1991); Shu et al., *PNAS* 90:7995-7999 (1993); y Skerra et al., *Science* 240:1038-1040 (1988).

20 Como alternativa al análisis de bibliotecas de anticuerpos recombinantes mediante la presentación en fagos, pueden aplicarse otras metodologías conocidas en la técnica para analizar grandes bibliotecas de combinación con el fin de identificar anticuerpos de especificidad doble de acuerdo con la invención. Un tipo de sistema de expresión alternativa es uno donde la biblioteca de anticuerpos recombinantes se expresa como

25 fusiones de ARN-proteínas, como se describe en la Publicación PCT Nº WO 98/31700, por Szostak y Roberts, y en Roberts, R.W. y Szostak, J.W. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:12297-12302. En este sistema, se crea una fusión covalente entre un ARNm y el péptido o la proteína que codifica mediante la traducción *in vitro* de ARNm sintéticos que contienen puromicina, un antibiótico aceptor de peptidilo, en su extremo 3'. Por

30 consiguiente, un ARNm específico puede enriquecerse a partir de una mezcla compleja de ARNm (por ejemplo, una biblioteca de combinación) sobre la base de las propiedades del péptido o la proteína codificada, por ejemplo, el anticuerpo o la porción de éste, tales como la unión del anticuerpo o la porción de éste al antígeno de especificidad doble. Las

35 secuencias de ácidos nucleicos que codifican anticuerpos o porciones de éstos, recuperadas del análisis de dichas bibliotecas, pueden expresarse por medios recombinantes como se describió con anterioridad (por ejemplo, en células huésped de mamífero), y más aún, pueden someterse a una maduración de afinidad adicional con

procedimientos adicionales de análisis de fusiones de ARNm-péptidos en cuyas secuencias originales se han introducido mutaciones, o con otros métodos de maduración por afinidad *in vitro* de anticuerpos recombinantes, como se describió con anterioridad.

En otro abordaje, los anticuerpos de la presente invención también pueden generarse usando métodos de presentación en levaduras conocidos en la técnica. En los métodos de presentación en levaduras, se usan métodos genéticos para unir dominios de anticuerpos a la pared celular de la levadura, de modo que sean presentados en la superficie de la levadura. En particular, estas levaduras pueden utilizarse para presentar dominios de unión a antígeno expresados a partir de un repertorio o una biblioteca de combinación de anticuerpos (por ejemplo, humanos o murinos). Los ejemplos de métodos de presentación en levaduras que pueden usarse para preparar los anticuerpos de la presente invención incluyen aquellos descritos en Wittrup, et al., Patente de los EEUU N° 6699658 incorporada en la presente documentación a modo de referencia.

4. Producción de anticuerpos recombinantes contra RGM A particulares de la invención

Los anticuerpos de la presente invención pueden producirse con cualquiera de una cantidad de procedimientos bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, la expresión puede efectuarse a partir de células huésped en las cuales se han transfectado uno o más vectores de expresión que codifican las cadenas pesada y liviana de acuerdo con procedimientos convencionales. Las diversas formas del término "transfección" abarcan una amplia variedad de procedimientos de uso común para la introducción de ADN exógeno en una célula huésped procariota o eucariota, por ejemplo, electroporación, precipitación con fosfato de calcio, transfección con DEAE-dextrano, y semejantes. Aunque es posible expresar los anticuerpos de la invención en células huésped procariotas o eucariotas, es preferible la expresión de los anticuerpos en células eucariotas, y es más preferible en células huésped de mamíferos, ya que la probabilidad de que se ensamble y se secrete un anticuerpo plegado correctamente y con actividad inmunológica es mayor en dichas células eucariotas (y en particular, en células de mamíferos) que en las células eucariotas.

Las células huésped de mamíferos preferidas para expresar los anticuerpos recombinantes de la invención incluyen células CHO (incluyendo las células CHO dhfr⁻ descritas en Urlaub y Chasin, (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4216-4220, que se usan en combinación con un marcador de selección DHFR, como se describe, por ejemplo, en R.J. Kaufman y P.A. Sharp (1982) *Mol. Biol.* 159:601-621), células de mieloma NS0, células COS y células SP2. Cuando los vectores de expresión recombinantes que contienen genes que codifican el anticuerpo se introducen en células huésped de mamíferos, los anticuerpos se producen cultivando las células huésped hasta

que el anticuerpo se expresa en dichas células huésped, o preferiblemente, el anticuerpo se secreta en el medio de cultivo en el que se cultivan las células huésped. Después, los anticuerpos pueden aislarse del medio de cultivo usando métodos de purificación de proteínas convencionales.

5 Del mismo modo, es posible usar células huésped para producir porciones de anticuerpos intactos, tales como fragmentos Fab o moléculas scFv. Ha de comprenderse que las variaciones del procedimiento anterior se hallan dentro del alcance de la presente invención. Por ejemplo, puede ser deseable transfectar una célula huésped con ADN que codifica fragmentos funcionales de la cadena liviana y/o la cadena pesada de un anticuerpo de esta invención. La tecnología de ADN recombinante también puede usarse para retirar una parte o la totalidad del ADN que codifica las cadena liviana y/o la cadena pesada que no es necesario para la unión con los antígenos de interés. Las moléculas expresadas a partir de dichas moléculas de ADN truncadas también quedan incluidas dentro de los anticuerpos de la invención. Además, es posible producir anticuerpos bifuncionales, donde una cadena pesada y una cadena liviana son un anticuerpo de la invención, y la otra cadena pesada y la otra cadena liviana tienen especificidad por un antígeno diferente del antígeno de interés, por medio del cruzamiento de un anticuerpo de la invención con un segundo anticuerpo, de acuerdo con métodos de cruzamiento químico convencionales.

20 En un sistema preferido para la expresión recombinante de un anticuerpo de la invención, o una porción de unión a antígeno de éste, se introduce un vector de expresión recombinante que codifica la cadena pesada del anticuerpo y la cadena liviana del anticuerpo en células CHO dhfr⁻ a través de una transfección mediada por fosfato de calcio. Dentro del vector de expresión recombinante, los genes de las cadenas pesada y liviana del anticuerpo están unidos operativamente en cada caso a elementos reguladores, que consisten en el potenciador de CMV y el promotor AdMLP, con el fin de obtener niveles de transcripción elevados de los genes. El vector de expresión recombinante también contiene un gen DHFR, que permite seleccionar las células CHO dhfr⁻ transfectadas con el vector usando una selección/amplificación con metotrexato. Las células huésped transformadas seleccionadas se cultivan de modo que se expresen las cadenas pesada y liviana del anticuerpo, y el anticuerpo intacto se aísla del medio de cultivo. Se usan técnicas convencionales de biología molecular para preparar el vector de expresión recombinante, transfectar las células huésped, seleccionar las transformantes, cultivar dichas células huésped y obtener el anticuerpo del medio de cultivo.

35 Adicionalmente, en la invención se provee un método para sintetizar un anticuerpo recombinante de la invención, que comprende cultivar una célula huésped de la invención en un medio de cultivo apropiado hasta que se ha sintetizado un anticuerpo recombinante

de la invención. Además, el método puede comprender aislar dicho anticuerpo recombinante del medio de cultivo.

4.1. Anticuerpos anti-RGM A

La Tabla 5 es una lista de secuencias de aminoácidos de regiones VH y VL de anticuerpos anti-hRGM A preferidos de la invención.

67
75

Tabla 5. Lista de secuencias de aminoácidos de regiones VH y VL de los anticuerpos anti-hRGM A 5F9 y 8D1

SEQ ID Nº	Región de la proteína		Secuencia
			123456789012345678901234567890
34	VH 5F9		EVQLVESGGGLVQPGSSSLKLSCVA SGFTFS NYGMN WIRQAPKKGLEWI GMIYYDSSEKHYADSVKGRFTISR DNSKNTLYLEMNSLRSEDTAIYYCA KG TTDPY WGQGVMVTVSS
57	VH 5F9 CDR-H1	Residuos 31-35 de SEQ ID Nº 34	NYGMN
58	VH 5F9 CDR-H2	Residuos 50-66 de SEQ ID Nº 34	MIYYDSSEKHYADSVKG
59	VH 5F9 CDR-H3	Residuos 99-104 de SEQ ID Nº 34	GTTPDY
10	VL 5F9		DWLTQTPVSLSVTLGDQASMSCR SSQSLEYSDGYTFLE WFLQKPGQS PQLLIY EVSNRFS GVDPDRFIGSGSG TDFTLKISRVEPEDLGVYYCF QATH DPLTFGSGTKLEIKR
60	VL 5F9 CDR-L1	Residuos 24-39 de SEQ ID Nº 10	RSSQSLEYSDGYTFLE
61	VL 5F9 CDR-L2	Residuos 55-61 de SEQ ID Nº 10	EVSNRFS
62	VL 5F9 CDR-L3	Residuos 94-102 de SEQ ID Nº 10	FQATHDPLT

SEQ ID Nº	Región de la proteína		Secuencia
			123456789012345678901234567890
55	VH 8D1		EVQLQQSGPELVKPGTSVKMSCKT SGYTFTSYVMHWVKQKPGQGLEW IGYIIPYNDNTKYNEKFKGKATLTSD KSSSTAYMELSSLTSEDSAVYYCA RRNEYYGSSFFDYWGQGTTTLTVSS
63	VH 8D1 CDR-H1	Residuos 31-35 de SEQ ID Nº 55	SYVMH
64	VH 8D1 CDR-H2	Residuos 50-66 de SEQ ID Nº 55	YIIPYNDNTKYNEKFKG
65	VH 8D1 CDR-H3	Residuos 97-110 de SEQ ID Nº 55	ARRNEYYGSSFFDY
56	VL 8D1		DIQMTQSPASLSASLEEIVTITCQAS QDIDNYLAWYHQKPGKSPRLIYG ATNLADGVPSRFSGSRSGTQFSLK INRLQIEDLGIYYCLQGYIPPRTFGG GTKLELKR
66	VL 8D1 CDR-L1	Residuos 24-34 de SEQ ID Nº 56	QASQDIDNYLA
67	VL 8D1 CDR-L2	Residuos 50-56 de SEQ ID Nº 56	GATNLAD
68	VL 8D1 CDR-L3	Residuos 89-97 de SEQ ID Nº 56	LQGYIPPRT

Las secuencias CDR aisladas de los anticuerpos anti-RGM A anteriores constituyen una nueva familia de proteínas de unión a RGM A, y han sido aisladas de acuerdo con esta invención. Para generar y seleccionar las CDR de la invención que tienen una actividad de unión y/o neutralización de RGM A preferida con relación a hRGM A, pueden usarse métodos convencionales conocidos en la técnica para generar las proteínas de unión de la presente invención y evaluar las características de unión y/o neutralización de RGM A de dichas proteínas de unión, incluyendo, no taxativamente, los métodos que se describen específicamente en la presente documentación.

4.2. Anticuerpos quiméricos anti-RGM A

Un anticuerpo quimérico es una molécula donde las distintas porciones del anticuerpo derivan de animales de distintas especies, tales como los anticuerpos que tienen una región variable que deriva de un anticuerpo monoclonal murino y una región constante de inmunoglobulina humana. Los métodos para producir anticuerpos quiméricos son conocidos en la técnica. Véanse, por ejemplo, Morrison, *Science* 229:1202 (1985); Oi et al., *BioTechniques* 4:214 (1986); Gillies et al., (1989) *J. Immunol. Métodos* 125:191-202; Patentes de los EEUU N° 5807715, 4816567 y 4816397, que se incorporan en la presente documentación a modo de referencia en su totalidad. Además, pueden usarse procedimientos desarrollados para la producción de "anticuerpos quiméricos" (Morrison et al., 1984, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 81:851-855; Neuberger et al., 1984, *Nature* 312:604-608; Takeda et al., 1985, *Nature* 314:452-454, que se incorporan en la presente documentación a modo de referencia en su totalidad) que comprenden separar genes de una molécula de anticuerpo de ratón con una especificidad antigénica apropiada y combinarlos con genes de una molécula de anticuerpo humano con una actividad biológica apropiada.

En una realización, los anticuerpos quiméricos de la invención se producen reemplazando la región constante de la cadena pesada de los anticuerpos monoclonales murinos anti-RGM A humana que se describen en la presente documentación por una región constante de IgG1 humana.

4.3. Anticuerpos anti-RGM A con injertos de CDR

Los anticuerpos con injertos de CDR de la invención comprenden secuencias de las regiones variables de las cadenas pesada y liviana de un anticuerpo humano, donde se han reemplazado una o más de las regiones CDR de V_H y/o V_L por secuencias CDR de anticuerpos no humanos, tales como, por ejemplo, los anticuerpos murinos de la invención. Una secuencia de la región del marco de cualquier anticuerpo humano puede servir como molde para el injerto de CDR. Sin embargo, el reemplazo directo de cadenas en una de estas regiones de marco comúnmente resulta en una cierta pérdida de afinidad de unión al antígeno. Cuanto más homólogo es un anticuerpo humano al anticuerpo

- murino original, menor es la probabilidad de que la combinación de las CDR murinas con la región del marco humana introduzca distorsiones en las CDR que puedan reducir la afinidad. Entonces, es preferible que la región variable del marco humano seleccionada para reemplazar la región variable del marco murino, aparte de las CDR, tenga al menos
- 5 a 65% de identidad de secuencia con la región variable del marco del anticuerpo murino. Es más preferible que las regiones variables humanas y murinas, aparte de las CDR, tengan al menos 70% de identidad de secuencia. Es aún más preferible que las regiones variables humanas y murinas aparte de las CDR tengan al menos 75% de identidad de secuencia. Es más preferible que las regiones variables humanas y murinas, aparte de las
- 10 CDR, tengan al menos 80% identidad de secuencia. En la técnica se conocen métodos para producir anticuerpos con injertos de CDR (Jones et al, Nature 321-525 (1986); US Pat. Nro. 5.225.539)

En una realización específica, en la invención se proveen anticuerpos con injertos de CDR con cadenas V_H y/o V_L como los que se describen en la tabla 6.

Tabla 6. Anticuerpos con injertos de CDR

SEQ ID N°	Región de la proteína	Secuencia
		123456789012345678901234567890
35 (15) (16) (17) (18)	VH 5F9.1-GL (VH3-48/JH3 FR1) (VH3-48/JH3 FR2) (VH3-48/JH3 FR3) (VH3-48/JH3 FR4)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAA SGFTFSNYGMNWVRQAPGKGLEW VSMIYYDSSEKHYADSVKGRFTISR DNAKNSLYLQMNSLRDEDTAVYYC ARGTTPDYWGQGTMTVTSS
36 (15) (16) (17) (19)	VH 5F9.2-GL (VH3-48/JH4 FR1) (VH3-48/JH4 FR2) (VH3-48/JH4 FR3) (VH3-48/JH4 FR4)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAA SGFTFSNYGMNWVRQAPGKGLEW VSMIYYDSSEKHYADSVKGRFTISR DNAKNSLYLQMNSLRDEDTAVYYC ARGTTPDYWGQGTMTVTSS
37 (15) (16) (17) (20)	VH 5F9.3-GL (VH3-48/JH6 FR1) (VH3-48/JH6 FR2) (VH3-48/JH6 FR3) (VH3-48/JH6 FR4)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAA SGFTFSNYGMNWVRQAPGKGLEW VSMIYYDSSEKHYADSVKGRFTISR DNAKNSLYLQMNSLRDEDTAVYYC ARGTTPDYWGQGTMTVTSS
38 (21) (22) (23) (18)	VH 5F9.4-GL (VH3-33/JH3 FR1) (VH3-33/JH3 FR2) (VH3-33/JH3 FR3) (VH3-33/JH3 FR4)	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCA ASGFTFSNYGMNWVRQAPGKGLE WVAMIYYDSSEKHYADSVKGRFTI SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVY YCARGTTPDYWGQGTMTVTSS
39 (21) (22) (23) (19)	VH 5F9.5-GL (VH3-33/JH4 FR1) (VH3-33/JH4 FR2) (VH3-33/JH4 FR3) (VH3-33/JH4 FR4)	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCA ASGFTFSNYGMNWVRQAPGKGLE WVAMIYYDSSEKHYADSVKGRFTI SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVY YCARGTTPDYWGQGTMTVTSS
40 (21) (22) (23) (20)	VH 5F9.6-GL (VH3-33/JH6 FR1) (VH3-33/JH6 FR2) (VH3-33/JH6 FR3) (VH3-33/JH6 FR4)	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCA ASGFTFSNYGMNWVRQAPGKGLE WVAMIYYDSSEKHYADSVKGRFTI SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVY YCARGTTPDYWGQGTMTVTSS

72
78

SEQ ID Nº	Región de la proteína	Secuencia
		12345678901234567890123456789 0
41 (24) (25) (26) (18)	VH 5F9.7-GL (VH3-23/JH3 FR1) (VH3-23/JH3 FR2) (VH3-23/JH3 FR3) (VH3-23/JH3 FR4)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAA SGFTFS NYGMN WVRQAPGKGLEW V SMIYYDSSEKHYADSVKGR FTISR DNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC AK GTTTPDYWGQGT MVTVSS
42 (24) (25) (26) (19)	VH 5F9.8-GL (VH3-23/JH4 FR1) (VH3-23/JH4 FR2) (VH3-23/JH4 FR3) (VH3-23/JH4 FR4)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAA SGFTFS NYGMN WVRQAPGKGLEW V SMIYYDSSEKHYADSVKGR FTISR DNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC AK GTTTPDYWGQGT LVTVSS
43 (24) (25) (26) (20)	VH 5F9.9-GL (VH3-23/JH6 FR1) (VH3-23/JH6 FR2) (VH3-23/JH6 FR3) (VH3-23/JH6 FR4)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAA SGFTFS NYGMN WVRQAPGKGLEW V SMIYYDSSEKHYADSVKGR FTISR DNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC AK GTTTPDYWGQGT TVTVSS
44 (27) (28) (29) (30)	VL 5F9.1-GL (A18/JK2 FR1) (A18/JK2 FR2) (A18/JK2 FR3) (A18/JK2 FR4)	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCR S SQSLEYSDGYTFLEW YLQKPGQSP QLLIY EVSNR FSGVPDRFSGSGSG TDFTLKISRVEAEDVGVYYC FQATH DPLTFGQGT KLEIKR
45 (31) (32) (33) (30)	VL 5F9.2-GL (A17/JK2 FR1) (A17/JK2 FR2) (A17/JK2 FR3) (A17/JK2 FR4)	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCR S SQSLEYSDGYTFLEW FQQRPQG S PRRLIY EVSNR FSGVPDRFSGSGS GTDFTLKISRVEAEDVGVYYC FQAT HDPLTFGQGT KLEIKR
46 (31) (28) (29) (30)	VL 5F9.3-GL (A17/JK2 FR1) (A18/JK2 FR2) (A18/JK2 FR3) (A18/JK2 FR4)	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCR S SQSLEYSDGYTFLEW YLQKPGQSP QLLIY EVSNR FSGVPDRFSGSGSG TDFTLKISRVEAEDVGVYYC FQATH DPLTFGQGT KLEIKR

Las secuencias CDR derivadas del anticuerpo monoclonal 5F9 se indican en negrita. También se hace referencia a las secuencias de marco específicas (FR1 a FR4)

73
79

al indicar los identificadores de secuencia correspondientes (véanse también las tablas 3 y 4)

4.4. Anticuerpos humanizados anti-RGM A

Los anticuerpos humanizados son moléculas de anticuerpos de especies no humanas que se unen al antígeno deseado y tienen una o más regiones de determinación de la complementariedad (CDR) de la especie no humana, y regiones de marco de una molécula de inmunoglobulina humana. Las secuencias de Ig humanas conocidas se describen, por ejemplo, en www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi; www.atcc.org/phage/hdb.html; www.sciquest.com/; www.abcam.com/; www.antibodyresource.com/onlinecomp.html; www.public.iastate.edu/.about.pedro/research_tools.html; www.mgen.uni-heidelberg.de/SD/IT/IT.html; www.whfreeman.com/inmunology/CH-05/kuby05.htm; www.library.thinkquest.org/12429/Inmune/Antibody.html; www.hhmi.org/grants/lectures/1996/vlab/; www.path.cam.ac.uk/.about.mrc7/mikeimages.html; www.anticuerporesource.com/; mcb.harvard.edu/BioLinks/Inmunology.html; www.inmunologylink.com/; pathbox.wustl.edu/.about.hcenter/index.html; www.biotech.ufl.edu/.about.hcl/; www.pebio.com/pa/340913/340913.html; www.nal.usda.gov/awic/pubs/antibody/; www.m.ehimeu.ac.jp/.about.yasuhito/Elisa.html; www.biodesign.com/table.asp; www.icnet.uk/axp/facs/davies/links.html; www.biotech.ufl.edu/.about.fccl/protocol.html; www.isacnet.org/sites_geo.html; aximtl.imt.uni-marburg.de/.about.rek/AEPStart.html; baserv.uci.kun.nl/.about.jraats/links1.html; www.recab.uni-hd.de/inmuno.bme.nwu.edu/; www.mrc-cpe.cam.ac.uk/imt-doc/public/INTRO.html; www.ibt.unam.mx/vir/V_mice.html; imgt.cnusc.fr:8104/; www.biochem.ucl.ac.uk/.about.martin/abs/index.html; antibody.bath.ac.uk/; abgen.cvm.tamu.edu/lab/wwwabgen.html; www.unizh.ch/.about.honegger/AHOseminar/Slide01.html; www.cryst.bbk.ac.uk/.about.ubcg07s/; www.nimr.mrc.ac.uk/CC/ccaewg/ccaewg.htm; www.path.cam.ac.uk/.about.mrc7/humanisation/TAHHP.html; www.ibt.unam.mx/vir/structure/stat_aim.html; www.biosci.missouri.edu/smithgp/index.html; www.cryst.bioc.cam.ac.uk/.about.fmolina/Webpages/Pept/spottech.html; www.jerini.de/fr [products.htm](http://www.products.htm); www.patents.ibm.com/ibm.html; Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, Departamento de Salud de los EEUU (1983), cada uno de los cuales se incorpora por completo en la presente documentación a modo de referencia. Estas secuencias importadas pueden usarse para reducir la inmunogenicidad o reducir, mejorar o modificar la afinidad de unión, la velocidad de activación, la velocidad de desactivación, la avidez, la especificidad, la vida media o cualquier otra característica apropiada, como es conocido en la técnica.

Los residuos de la región del marco en las regiones del marco humano pueden reemplazarse por los residuos correspondientes de la CDR del anticuerpo donante para alterar, preferiblemente mejorar la unión al antígeno. Estas sustituciones en el marco se identifican con métodos bien conocidos en la técnica, por ejemplo, preparando modelos de las interacciones entre las CDR y los residuos del marco, para identificar los residuos del marco que son importantes para la unión al antígeno, y realizando comparaciones de secuencia para identificar residuos de marco inusuales en posiciones particulares (véanse, por ejemplo, Queen et al., Patente de los EEUU N° 5585089; Riechmann et al., Nature 332:323 (1988), que se incorporan en la presente documentación a modo de referencia en su totalidad). Los modelos tridimensionales de la inmunoglobulina se hallan disponibles y son conocidos por aquellos entrenados en la técnica. Hay programas informáticos disponibles que permiten ilustrar y presentar estructuras conformacionales tridimensionales de secuencias de inmunoglobulinas candidatas seleccionadas. La inspección de estas representaciones permite analizar la participación de los residuos en el funcionamiento de la secuencia de inmunoglobulina candidata, es decir, el análisis de los residuos que influyen en la capacidad de unión de la inmunoglobulina candidata a su antígeno. De este modo, pueden aislarse y combinarse residuos FR de secuencias consenso e importadas con el fin de obtener una característica deseada en el anticuerpo, tal como la afinidad de unión por uno o más antígenos blanco. En general, los residuos de las CDR tienen una influencia directa y más sustancial sobre la unión al antígeno. Los anticuerpos pueden humanizarse usando una variedad de procedimientos conocidos en la técnica, tales como, no taxativamente, los que se describen en Jones et al., Nature 321:522 (1986); Verhoeven et al., Science 239:1534 (1988)), Sims et al., J. Immunol. 151: 2296 (1993); Chotia y Lesk, J. Mol. Biol. 196:901 (1987), Carter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 89:4285 (1992); Presta et al., J. Immunol. 151:2623 (1993), Padlan, Molecular Immunology 28(4/5):489-498 (1991); Studnicka et al., Protein Engineering 7(6):805-814 (1994); Roguska. et al., PNAS 91:969-973 (1994); publicación PCT WO 91/09967, PCT/: US98/16280, US96/18978, US91/09630, US91/05939, US94/01234, GB89/01334, GB91/01134, GB92/01755; WO90/14443, WO90/14424, WO90/14430, EP 229246, EP 592106; EP 519596, EP 239400, Patentes de los EEUU N° 5565332, 5723323, 5976862, 5824514, 5817483, 5814476, 5763192, 5723323, 5766886, 5714352, 6204023, 6180370, 5693762, 5530101, 5585089, 5225539, 4816567, cada una de las cuales se incorpora en la presente documentación a modo de referencia en su totalidad, incluidas las referencias citadas en ellas.

35 **5. Otras realizaciones de anticuerpos de la invención**

5.1. Anticuerpos de fusión e inmunoadhesinas

75
81

En esta solicitud también se describe la preparación de un anticuerpo de fusión o una inmunoadhesina que comprende la totalidad o una porción de un anticuerpo contra RGM A de esta solicitud unido a otro polipéptido. En algunas realizaciones, solamente se une la región variable del anticuerpo contra RGM A a un polipéptido. En otras realizaciones, se une el dominio VH de un anticuerpo contra RGM A de esta solicitud a un primer polipéptido, mientras que el dominio VL del anticuerpo se une a un segundo polipéptido, el cual se asocia con el primer polipéptido de una manera tal que permite que los dominios VH y VL interactúen uno con otro para formar un sitio de unión a anticuerpos. En otras realizaciones, el dominio VH se separa del dominio VL con un conector que permite la interacción entre los dominios VH y VL (véase la descripción de los anticuerpos de cadenas simples más adelante). Después, el anticuerpo compuesto por VH-conector-VL se une a un polipéptido de interés. El anticuerpo de fusión es útil para dirigir un polipéptido a una célula o un tejido donde se expresa RGM A. El polipéptido de interés puede ser un agente terapéutico, tal como una toxina, o puede ser un agente de diagnóstico, tal como una enzima que puede ser visualizada con facilidad, tal como la peroxidasa de rábano picante. Además, es posible crear anticuerpos de fusión donde haya dos (o más) anticuerpos de cadena simple unidos. Esto es útil cuando se desea crear un anticuerpo divalente o polivalente en una sola cadena de polipéptido, o si se desea crear un anticuerpo biespecífico.

En una realización, se provee una proteína de unión marcada donde se ha derivatizado o conectado un anticuerpo o una porción de anticuerpo de esta solicitud con otra molécula funcional (por ejemplo, otro péptido u otra proteína). Por ejemplo, una proteína de unión marcada de esta solicitud puede derivatizarse uniendo de manera funcional un anticuerpo o una porción de anticuerpo de esta solicitud (por medio de una unión química, una fusión genética, una asociación no covalente, o a través de otro medio) a una o más entidades moleculares diferentes, tales como ácidos nucleicos, otros anticuerpos (por ejemplo, un anticuerpo biespecífico o un diacuerpo), un agente de detección, un agente citotóxico, un agente farmacéutico y/o una proteína o un péptido que pueden mediar en la asociación del anticuerpo o la porción de anticuerpo con otra molécula (tal como la región nuclear de la estreptavidina o una marca de polihistidina).

Los agentes de detección útiles con los cuales puede derivatizarse un anticuerpo o una porción de anticuerpo de esta solicitud incluyen compuestos fluorescentes. Entre los ejemplos de agentes fluorescentes detectables se incluyen la fluoresceína, el isotiocianato de fluoresceína, la rodamina, el cloruro de 5-dimetilamina-1-napfalensulfonilo, la ficoeritrina, y semejantes. Un anticuerpo también puede derivatizarse con enzimas detectables, tales como la fosfatasa alcalina, la peroxidasa de rábano picante, la glucosa oxidasa, y semejantes. Cuando el anticuerpo se derivatiza con una enzima detectable, es

detectado mediante el agregado de reactivos adicionales que la enzima utiliza para producir un producto de reacción detectable. Por ejemplo, cuando se encuentra presente la peroxidasa de rábano picante como agente detectable, la adición de peróxido de hidrógeno y diaminobencidina genera un producto de reacción con color, el cual es detectable. Un anticuerpo también puede derivatizarse con un ácido nucleico, biotina y detectarse a través de una medida indirecta de la unión de avidina o estreptavidina.

5.2. Anticuerpos de cadena simple

En esta solicitud se incluye un anticuerpo de cadena simple (scFv) que se une a una RGM A inmunogénica de la invención. Para producir el scFv, se une operativamente el ADN que codifica VH y VL a un ADN que codifica un conector flexible, por ejemplo, que codifica la secuencia de aminoácidos (Gly4-Ser), de modo tal que las secuencias VH y VL pueden expresarse como una proteína de una sola cadena contigua, con las regiones VL y VH unidas por un conector flexible (véanse, por ejemplo, Bird et al. (1988) Science 242:423-426; Huston et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 5879-5883; McCafferty et al., 30 Nature (1990) 348: 552-554). El anticuerpo de cadena simple puede ser monovalente si se usa una sola VH y una sola VL, bivalente si se usan dos VH y dos VL, o polivalente, si se usan más VH y VL. A dos de los fragmentos scFv mencionados unidos por un conector se les da el nombre de "diacuerpo", y se trata de una forma que también está abarcada por la invención.

5.3. Anticuerpos biespecíficos

Adicionalmente, en esta solicitud se incluye un anticuerpo biespecífico, o un fragmento de unión a antígeno de éste, donde una especificidad es por un polipéptido inmunogénico de RGM A de esta solicitud. Por ejemplo, es posible generar un anticuerpo biespecífico que se una específicamente a un polipéptido inmunogénico de RGM A de la invención a través de un dominio de unión, y a una segunda molécula a través de un segundo dominio de unión. Además, es posible generar un anticuerpo de cadena simple que contiene más de una VH y una VL que se una específicamente a un polipéptido inmunogénico de la invención y a otra molécula que esté asociada con la atenuación del colapso del cono de crecimiento mediado por la mielina y la inhibición del desarrollo y la brotación de las neuritas. Estos anticuerpos biespecíficos pueden generarse usando procedimientos que son bien conocidos, por ejemplo, Fanger et al. Immunol Methods 4: 72-81 (1994) y Wright y Harris, 20 (supra).

En algunas realizaciones, los anticuerpos biespecíficos se preparan usando una o más regiones variables de anticuerpos de la invención. En otra realización, el anticuerpo biespecífico se prepara usando una o más regiones CDR de dicho anticuerpo.

5.4. Anticuerpos derivatizados y marcados

Un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno de esta solicitud pueden derivatizarse o conectarse con otra molécula (por ejemplo, otro péptido u otra proteína). En general, el anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno se derivatizan de modo tal que la unión a un polipéptido inmunogénico de la invención no se ve afectada de manera
5 adversa por la derivatización o la marca.

Por ejemplo, un anticuerpo o una porción de anticuerpo de esta solicitud pueden unirse funcionalmente (por medio de una unión química, una fusión genética, una asociación no covalente, o a través de otro medio) a una o más entidades moleculares diferentes, tales como otro anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo biespecífico o un
10 diacuerpo), un reactivo de detección, un agente citotóxico, un agente farmacéutico y/o una proteína o un péptido que pueden mediar en la asociación del anticuerpo o la porción de anticuerpo con otra molécula (tal como la región nuclear de la estreptavidina o una marca de polihistidina). Adicionalmente, un anticuerpo, o una porción de unión a antígeno de éste, puede ser parte de moléculas de inmunoadhesión más grandes, formadas mediante
15 la asociación covalente o no covalente del anticuerpo o la porción de anticuerpo con una o más proteínas o péptidos diferentes. Los ejemplos de estas moléculas de inmunoadhesión incluyen el uso de la región central de la estreptavidina para preparar una molécula de scFv tetramérica (Kipriyanov, *et al.* (1995) *Human Antibodies y Híbridos* 6:93-101) y el uso de un residuo de cisteína, un péptido marcador y una
20 marca de polihistidina C-terminal para preparar moléculas scFv bivalentes y biotiniladas (Kipriyanov, *et al.* (1994) *Molecular Immunology* 31:1047-1058). Las porciones de los anticuerpos, tales como los fragmentos Fab y F(ab')₂, pueden prepararse a partir de anticuerpos completos usando técnicas convencionales, tales como la digestión con papaína o pepsina, respectivamente, de anticuerpos completos. Más aún, los anticuerpos,
25 las porciones de anticuerpos y las moléculas de inmunoadhesión pueden obtenerse usando técnicas de ADN recombinante.

Un anticuerpo derivatizado puede producirse combinando dos o más anticuerpos (del mismo tipo o de tipos diferentes, por ejemplo, para crear anticuerpos biespecíficos). Los agentes de combinación apropiados incluyen aquellos que son heterobifuncionales,
30 que tienen dos grupos con reactividades diferentes separados por un separador apropiado (por ejemplo el éster de m-maleimidobenzoil-N-hidroxisuccinimida), o aquellos que son homobifuncionales (por ejemplo, el suberato de disuccinimidilo). Estos conectores están disponibles en Pierce Chemical Company, Rockford, Ill.

Un anticuerpo derivatizado también puede ser un anticuerpo marcado. Por
35 ejemplo, los agentes de detección con los cuales puede derivatizarse un anticuerpo o una porción de anticuerpo de la invención incluyen compuestos fluorescentes, incluyendo fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, cloruro de 5-dimetilamin-1-

naftalensulfonilo, ficoeritrina, lantánidos fosforados, y semejantes. Un anticuerpo también puede marcarse con enzimas que son útiles para detectarlo, tales como la peroxidasa de rábano picante, la galactosidasa, la luciferasa, la fosfatasa alcalina, la glucosa oxidasa, y semejantes. En aquellas realizaciones donde la marca es una enzima detectable, el anticuerpo se detecta agregando reactivos adicionales que son usados por la enzima para producir un producto de reacción detectable. Por ejemplo, la peroxidasa de rábano picante con peróxido de hidrógeno y diaminobenzidina. Un anticuerpo también puede marcarse con biotina y detectarse mediante la medición indirecta de la unión de avidina o estreptavidina. Un anticuerpo también puede marcarse con un epítopo polipeptídico predeterminado que será reconocido por una marca secundaria (por ejemplo, secuencias de pares de cierres de leucina, sitios de unión para anticuerpos secundarios, dominios que se unen a metales, marcas de epítopes). Un anticuerpo contra RGM A o un fragmento de unión a antígeno de éste también pueden marcarse con un aminoácido radiomarcado. La radiomarca puede usarse para fines de diagnóstico y terapéuticos. El anticuerpo contra RGM A radiomarcado puede usarse con fines de diagnóstico, por ejemplo, para determinar los niveles del receptor de RGM A en un sujeto. Además, el anticuerpo contra RGM A radiomarcado puede usarse con fines terapéuticos, para tratar lesiones en la médula espinal.

Los ejemplos de marcas para polipéptidos incluyen, no taxativamente, los siguientes radioisótopos o radionucleidos ^{15}N , ^{35}S , ^{90}Y , ^{99}Tc , ^{111}In , ^{125}I , ^{131}I , ^{177}Lu , ^{166}Ho , ^{153}Sm . Un anticuerpo contra RGM A o un fragmento de unión a antígeno de éste también pueden derivatizarse con un grupo químico, tal como polietilenglicol (PEG), un grupo metilo o etilo, o un grupo de hidrato de carbono. Estos grupos pueden ser útiles para mejorar las características biológicas del anticuerpo, por ejemplo, para incrementar la vida media en suero o incrementar la unión en el tejido. También, una marca para polipéptidos puede incluir un ácido nucleico, por ejemplo, ADN, para la detección por PCR o con el fin de potenciar la expresión genética, o ARNpi, para suprimir la expresión genética en las células o los tejidos que presentan RGM A.

La clase y la subclase de los anticuerpos contra RGM A pueden determinarse con cualquier método conocido en la técnica. En general, la clase y la subclase de un anticuerpo pueden determinarse usando anticuerpos que son específicos para una clase y una subclase de anticuerpos particulares. Estos anticuerpos están disponibles comercialmente. La clase y la subclase pueden determinarse por ELISA, Western Blot, y también con otras técnicas. Como alternativa, la clase y la subclase pueden determinarse secuenciando la totalidad o una porción de las cadenas pesada y/o liviana de los anticuerpos, comparando sus secuencias de aminoácidos con las secuencias de

aminoácidos de diversas clases y subclases de inmunoglobulinas conocidas, y determinando la clase y la subclase de los anticuerpos.

5.5. Inmunoglobulinas con dos dominios variables

Las proteínas o las inmunoglobulinas de unión de dominio variable doble (DVD), tal como se las usa en la presente documentación, son proteínas de unión que comprenden dos o más sitios de unión a antígeno, y son proteínas de unión multivalentes, por ejemplo, divalentes y tetravalentes. En esta memoria descriptiva se usa el término "proteína de unión multivalente" para hacer referencia a una proteína de unión que comprende dos o más sitios de unión a antígeno. La proteína de unión multivalente preferiblemente se diseña para que tenga dos o más sitios de unión a antígeno, y generalmente no es un anticuerpo de origen natural. El término "proteína de unión multiespecífica" hace referencia a una proteína de unión con la capacidad de unir dos o más blancos relacionados o no relacionados. Dichos DVD pueden ser monoespecíficos, es decir, con la capacidad de unir un antígeno, o multiespecíficos, es decir, con la capacidad de unir dos o más antígenos. Las proteínas de unión DVD que comprenden dos polipéptidos DVD de cadena pesada y dos polipéptidos DVD de cadena liviana se conocen como una Ig DVD. Cada mitad de una Ig DVD comprende un polipéptido DVD de cadena pesada, y un polipéptido DVD de cadena liviana, y dos sitios de unión a antígeno. Cada sitio de unión comprende un dominio variable de cadena pesada y un dominio variable de cadena liviana, con la participación de un total de 6 CDR en la unión a antígeno por sitio de unión a antígeno. Las proteínas de unión DVD, y los métodos para preparar las proteínas de unión DVD, se describen en la Solicitud de Patente de los EEUU Nº 11/507050, que se incorpora en la presente documentación a modo de referencia. En la presente invención se incluye una proteína de unión DVD que comprende proteínas de unión capaces de unirse a RGM A. Preferiblemente la proteína de unión DVD es capaz de unirse a RGM A y un segundo blanco. El segundo blanco se selecciona del grupo que consiste en anticuerpos monoclonales con actividades antiinflamatorias (IL-1, IL-6, IL-8, IL-11, IL-12, IL-17, IL-18, IL-23, TNF alfa/beta, IFN-beta, gamma, LIF, OSM, CNTF, PF-4, proteína básica de las plaquetas (PBP), NAP-2, beta-TG, MIP-1, MCP2/3, RANTES, linfotactina), proteínas que median en el transporte (receptor de insulina, receptor de transferrina, receptor de trombina, receptor de leptina, receptor de LDL), otros anticuerpos monoclonales indicadores de neuroregeneración (NgR, Lingo, p75), CSPG (por ejemplo, NG-2, neurocán, brevicán, versicán, agregcán, ácido hialurónico, mAG, tenascina, NI-35, NI-250, IMP, perlecán, neurocán, fosfacán, nogo-A, OMGP, Sema4D, Sema 3A, efrina B3, efrina A2, efrina A5, MAG, EphA4, plexina B1, TROY, wnts, ryk rec., BMP-2, BMP-4, BMP-7), anticuerpos monoclonales con actividades de neuroprotección (EGF, EGFR, Sema 3), anticuerpos monoclonales anti-beta amiloides (por ejemplo, m266, 3D6

(bapineuzumab), anticuerpos monoclonales anti-globulímero 7C6), receptores y transportadores localizados en el SNC (receptores de serotonina, receptores de dopamina, DAT, Asc-1, GlyT1).

5.6. Anticuerpos con especificidad doble

5 En esta solicitud también se describe la tecnología de los "anticuerpos con especificidad doble". Los anticuerpos con especificidad doble pueden servir como agonistas, antagonistas, o ambos en distintas combinaciones. Los anticuerpos con especificidad doble son anticuerpos donde la cadena VH se une a un primer antígeno y la cadena VL se une a otro antígeno, como se describe, por ejemplo, en WO 2008082651.

10 5.7. Anticuerpos cristalizados

En otra realización de esta solicitud, se provee una proteína de unión cristalizada. El término "cristalizado", como se lo usa en la presente documentación, hace referencia a un anticuerpo o una porción de unión a antígeno de éste que existe en forma de un cristal. Los cristales son una forma de materia en estado sólido que es diferente de otras formas, 15 tales como el estado sólido amorfo o el estado líquido cristalino. Los cristales están compuestos por disposiciones de átomos, iones o moléculas tridimensionales, repetitivas y regulares (por ejemplo, proteínas, tales como anticuerpos), o ensamblajes moleculares (por ejemplo, complejos de antígenos/anticuerpos). Estas disposiciones tridimensionales siguen relaciones matemáticas bien comprendidas en el campo. La unidad fundamental, o 20 bloque de construcción, que se repite en un cristal, se denomina unidad asimétrica. La repetición de la unidad asimétrica en una disposición que satisface una simetría cristalográfica dada y bien definida provee la "célula individual" del cristal. La repetición de la célula individual por repeticiones regulares en las tres dimensiones provee el cristal. Véanse Giege, R. y Ducruix, A. Barrett, Crystallization of Nucleic Acids and Proteins, a 25 Practical Approach, 2ª edición, pp. 20 1-16, Oxford University Press, Nueva York, Nueva York, (1999).

Preferiblemente, en esta solicitud se describen cristales de anticuerpos contra RGM completos y fragmentos de éstos, como se detalla en la presente documentación, y formulaciones y composiciones que comprenden dichos cristales. En una realización, las 30 proteínas de unión cristalizadas tienen una vida media *in vivo* más larga que la contraparte soluble de la proteína de unión. En otra realización, la proteína de unión conserva su actividad biológica después de la cristalización.

Las proteínas de unión cristalizadas de la invención pueden producirse de acuerdo con métodos conocidos en la técnica y descritos en WO 02072636, incorporada en la 35 presente documentación a modo de referencia.

5.8. Anticuerpos glicosilados

En realización de la invención, se provee una proteína de unión glicosilada, donde el anticuerpo o la porción de unión a antígeno de éste comprenden uno o más residuos de hidrato de carbono. La producción nativa de proteínas *in vivo* puede incluir un procesamiento adicional, conocido como modificación postraducciona. En particular, pueden agregarse residuos de azúcares (glicosilo) en forma enzimática, un proceso conocido como glicosilación. Las proteínas resultantes, que contienen cadenas laterales de oligosacáridos unidas en forma covalente, son conocidas como proteínas glicosiladas o glicoproteínas. Los anticuerpos son glicoproteínas con uno o más residuos de hidrato de carbono en el dominio Fc, así como en el dominio variable. Los residuos de hidrato de carbono en el dominio Fc tienen un efecto importante en la función efectora del dominio Fc, con un efecto menor en la unión a antígeno o la vida media del anticuerpo (R. Jefferis, *Biotechnol. Prog.* **21** (2005), páginas 11-16). Por el contrario, la glicosilación del dominio variable puede tener efecto sobre la actividad de unión a antígeno del anticuerpo. La glicosilación en el dominio variable puede tener un efecto negativo sobre la afinidad de unión del anticuerpo, probablemente debido a impedimento estérico (Co, M.S., *et al.*, *Mol. Immunol.* (1993) 30:1361-1367), o puede dar como resultado una afinidad aumentada por el antígeno (Wallick, S.C., *et al.*, *Exp. Med.* (1988) 168:1099-1109; Wright, A., *et al.*, *EMBO J.* (1991) 10:2717-2723).

Un aspecto de la presente invención se relaciona con la generación de mutantes de sitios de glicosilación en las cuales se ha mutado el sitio de glicosilación unido a O o N de la proteína de unión. Aquél entrenado en la técnica puede generar dichos mutantes con el uso de tecnologías convencionales bien conocidas. Los mutantes de sitios de glicosilación que retienen la actividad biológica, pero presentan una actividad de unión incrementada o disminuida, son otro objeto de la presente invención.

En aún otra realización, se modifica la glicosilación del anticuerpo o porción de unión a antígeno de la invención. Por ejemplo, es posible generar un anticuerpo no glicosilado (es decir, el anticuerpo carece de glicosilación). La glicosilación puede alterarse, por ejemplo, para incrementar la afinidad del anticuerpo por el antígeno. Dichas modificaciones del hidrato de carbono pueden obtenerse, por ejemplo, mediante la alteración de uno o más sitios de glicosilación en la secuencia del anticuerpo. Por ejemplo, pueden realizarse una o más sustituciones de aminoácidos que den como resultado la eliminación de uno o más sitios de glicosilación en la región variable, para eliminar de este modo la glicosilación en ese sitio. Dicha aglicosilación puede incrementar la afinidad del anticuerpo por el antígeno. Este abordaje se describe con mayor detalle en la publicación PCT WO2003016466A2 y las Patentes de los EEUU Nº 5714350 y 6350861, cada una de las cuales se incorpora en la presente documentación a modo de referencia en su totalidad.

Adicionalmente o como alternativa, puede prepararse un anticuerpo modificado de la invención que tenga un tipo de glicosilación alterada, tal como un anticuerpo hipofucosilado que tenga cantidades reducidas de residuos fucosilo o un anticuerpo que tenga incrementadas las estructuras de GlcNAc bifurcadas. Se ha demostrado que dichos patrones de glicosilación alterados incrementan la capacidad de los anticuerpos de producir ADCC. Dichas modificaciones de los hidratos de carbono pueden efectuarse, por ejemplo, expresando el anticuerpo en una célula huésped con la maquinaria de glicosilación alterada. En la técnica se han descrito células con la maquinaria de glicosilación alterada, que pueden ser usadas como células huésped para expresar los anticuerpos recombinantes de la invención, y de este modo, producir un anticuerpo con glicosilación alterada. Véanse, por ejemplo, Shields, R. L. *et al.* (2002) *J. Biol. Chem.* 277:26733-26740; Umana *et al.* (1999) *Nat. Biotech.* 17:176-1, y también la Patente Europea Nº EP 1176195, las publicaciones PCT WO 03/035835 y WO 99/54342 80, cada una de las cuales se incorpora en la presente documentación a modo de referencia en su totalidad.

La glicosilación de proteínas depende de la secuencia de aminoácidos de la proteína de interés, así como de la célula huésped en la cual se expresa la proteína. Distintos organismos pueden producir enzimas de glicosilación diferentes (por ejemplo, glicosiltransferasas y glicosidasas), y pueden tener diferentes sustratos (azúcares nucleotídicos) disponibles. Debido a dichos factores, el patrón de glicosilación, y la composición de residuos glicosídicos, pueden diferir dependiendo del sistema huésped en el cual se expresa la proteína en particular. Entre los residuos glicosídicos útiles en la invención pueden incluirse, no taxativamente, glucosa, galactosa, manosa, fucosa, n-acetilglucosamina y ácido siálico. Preferiblemente, la proteína de unión glicosilada comprende residuos glicosídicos que permiten obtener un patrón de glicosilación humano.

Aquellos entrenados en la técnica saben que el cambio en las glicosilaciones de proteínas puede dar como resultado diferentes características en la proteína. Por ejemplo, la eficacia de una proteína terapéutica producida por un microorganismo huésped, tal como una levadura, y glicosilada usando la vía endógena de la levadura, puede ser reducida en comparación con la de la misma proteína expresada en una célula de mamífero, tal como una línea celular CHO. Dichas glicoproteínas también pueden ser inmunogénicas en seres humanos y presentar una vida media reducida *in vivo* después de la administración. Receptores específicos en humanos y otros animales pueden reconocer residuos glicosídicos específicos y promover la rápida eliminación de la proteína del torrente sanguíneo. Entre otros efectos adversos pueden incluirse cambios en el plegamiento de las proteínas, su solubilidad, su susceptibilidad a proteasas, su circulación, su transporte, su compartimentalización, su secreción, el reconocimiento por

otras proteínas o factores, su antigenicidad, o su alergenidad. En consecuencia, un profesional puede preferir una proteína terapéutica con una composición y un patrón de glicosilación específicos, por ejemplo, una composición de glicosilación y un patrón idénticos, o al menos similares, a los producidos en las células humanas o las células con especificidad de especie del animal sujeto previsto.

La expresión de proteínas glicosiladas diferentes de las de una célula huésped puede llevarse a cabo mediante la modificación genética de la célula huésped para expresar enzimas de glicosilación heterólogas. Usando procedimientos conocidos en la técnica, un profesional puede generar anticuerpos o porciones de unión a antígenos de éstos que presenten la glicosilación de las proteínas humanas. Por ejemplo, se han modificado cepas de levadura para expresar enzimas de glicosilación de origen no natural, tales como las proteínas glicosiladas (glicoproteínas) producidas en estas cepas de levaduras que presentan una glicosilación proteica idéntica a aquella de las células animales, especialmente las células humanas (Solicitud de Patente de los EEUU 20040018590 y 20020137134, y Solicitud PCT WO 05/100584 A2).

Además, aquellos entrenados en la técnica han de apreciar que es posible expresar una proteína de interés usando una biblioteca de células huésped modificadas para que en ellas se expresen diversas enzimas de glicosilación, de modo que las células huésped que conforman la biblioteca produzcan la proteína de interés con patrones de glicosilación alternativos. Posteriormente, aquellos entrenados en la técnica han de poder seleccionar y aislar la proteína de interés con los patrones de glicosilación novedosos mencionados. Preferiblemente, la proteína seleccionada que tiene un patrón de glicosilación novedoso presenta propiedades biológicas mejoradas o alteradas.

5.9. Anticuerpos anti-idiotípicos

Además de las proteínas de unión, la presente invención también está relacionada con un anticuerpo anti-idiotípico (anti-Id) específico para las proteínas de unión de la invención. Un anticuerpo anti-Id es un anticuerpo que reconoce determinantes únicos generalmente asociados con la región de unión a antígeno de otro anticuerpo. El anti-Id puede prepararse mediante la inmunización de un animal con la proteína de unión o con una región que contenga su CDR. El animal inmunizado reconocerá y responderá a los determinantes idiotípicos del anticuerpo inmunizante, y producirá un anticuerpo anti-Id. El anticuerpo anti-Id también puede ser usado como un "inmunógeno" para inducir una respuesta inmune en aún otro animal, con lo que se produce lo que se conoce como anticuerpo anti-anti-Id.

6. Usos de los anticuerpos

En virtud de su capacidad de unirse a RGM A humana, los anticuerpos neutralizadores de esta solicitud, o porciones de éstos, pueden usarse para detectar RGM

A humana (por ejemplo, en una muestra biológica, tal como suero o plasma) usando un inmunoensayo convencional, tal como un ensayo inmunosorbente ligado a enzimas (ELISA), un radioinmunoensayo (RIA) o inmunohistoquímica en tejido. En esta solicitud se provee un método para detectar RGM A humana en una muestra biológica, que
5 comprende poner en contacto una muestra biológica con un anticuerpo o una porción de anticuerpo de la invención, y detectar el anticuerpo (o la porción de anticuerpo) unido a la RGM A humana, o el anticuerpo (o la porción de anticuerpo) no unido, para detectar de este modo la RGM A humana en la muestra biológica. El anticuerpo se marca directa o indirectamente con una sustancia detectable para facilitar la detección del anticuerpo
10 unido o no unido. Entre las sustancias detectables apropiadas se incluyen distintas enzimas, grupos prostéticos, materiales fluorescentes, materiales luminiscentes y materiales radioactivos. Entre los ejemplos apropiados de enzimas, se incluye la peroxidasa de rábano picante, la fosfatasa alcalina, la beta-galactosidasa o la acetilcolinesterasa; entre los ejemplos de grupos prostéticos complejos apropiados, se
15 incluye la estreptavidina/biotina y la avidina/biotina; entre los ejemplos de materiales fluorescentes apropiados, se incluye la umbeliferona, la fluoresceína, el isotiocianato de fluoresceína, la rodamina, la diclorotriazinilamino fluoresceína, el cloruro de dansilo o la ficoeritrina; un ejemplo de un material luminiscente incluye luminol; y entre los ejemplos de materiales radioactivos apropiados, se incluyen ^3H , ^{14}C , ^{35}S , ^{90}Y , ^{99}Tc , ^{111}In , ^{125}I , ^{131}I ,
20 ^{177}Lu , ^{166}Ho , ^{153}Sm .

Los anticuerpos y las porciones de anticuerpos de esta solicitud preferiblemente son capaces de neutralizar la actividad de la RGM A humana tanto *in vitro* como *in vivo*. Por consiguiente, estos anticuerpos y porciones de anticuerpos de la invención pueden usarse para inhibir la unión de RGM A a su receptor, la neogenina, o a BMP-2 y/o BM-4,
25 con lo que es posible inhibir a actividad resultante.

En otra realización, en esta solicitud se provee un método para reducir la actividad de RMG A en un sujeto, ventajosamente un sujeto afectado por una enfermedad o un trastorno donde la actividad resultante de RGM A es perjudicial. En esta solicitud se proveen métodos para reducir la actividad de RGM A en un sujeto afectado por dicha
30 enfermedad o trastorno al prevenir la unión de RGM A a la neogenina, y/o a BMP-2 y/o BMP-4, que comprenden el uso de los anticuerpos monoclonales de esta solicitud. Los anticuerpos de esta solicitud, particularmente los anticuerpos humanizados que se describen en la presente documentación, pueden administrársele a un sujeto humano para propósitos terapéuticos. Más aún, los anticuerpos de esta solicitud pueden
35 administrársele a un mamífero no humano en el que se expresa una RGM A con la cual puede unirse el anticuerpo, para propósitos veterinarios o como un modelo animal de una enfermedad humana. Con relación a esto último, dichos modelos animales pueden ser

útiles para evaluar la eficacia terapéutica de los anticuerpos de la invención (por ejemplo, evaluando las dosificaciones y la progresión de la administración en el tiempo).

Como se lo usa en la presente documentación, el término "un trastorno donde la actividad de RGM A es perjudicial" incluye enfermedades y otros trastornos de los que se ha demostrado que la presencia de RGM A o su actividad resultante en un sujeto afectado por el trastorno es responsable de la patofisiología del trastorno, o es un factor que contribuye al empeoramiento del trastorno, o bien se sospecha lo anterior. Por ende, un trastorno donde la actividad de RGM A es perjudicial es un trastorno donde se espera que la reducción de la actividad de RGM A alivie los síntomas y/o el progreso del trastorno. Entre los ejemplos no limitativos de trastornos que pueden tratarse con los anticuerpos de la invención, se incluyen aquellos trastornos indicados en la sección anterior, relacionada con composiciones farmacéuticas de los anticuerpos de la invención.

Se reconoce que RGM A tiene una participación importante en la patología asociada con una variedad de enfermedades que comprenden enfermedades neurológicas asociadas con la neurodegeneración o la inhibición procesos neurorregenerativos, lo cual da como resultado parálisis. Estas enfermedades incluyen la demencia, la demencia senil, la alteración cognitiva leve, la demencia relacionada con la enfermedad de Alzheimer, la corea de Huntington, la disquinesia tardía, la hiperquinesia, la manía, el morbo de Parkinson, el síndrome de Steel-Richard, el síndrome de Down, la miastenia grave, el traumatismo nervioso, la amiloidosis vascular, la hemorragia cerebral con amiloidosis, la inflamación cerebral, el trastorno de confusión aguda, la esclerosis lateral amiotrófica, el glaucoma, la enfermedad de Alzheimer, la esclerosis lateral amiotrófica, la lesión del plexo braquial, la lesión cerebral, incluyendo la lesión cerebral traumática, la parálisis cerebral, el síndrome de Guillain Barre, la leucodistrofia, la esclerosis múltiple, el síndrome posterior a la poliomielitis, la espina bífida, las lesiones en la médula espinal, la atrofia muscular espinal, los tumores espinales, el accidente cerebrovascular y la mielitis transversal.

También, como se mencionó con anterioridad, pueden usarse inmunoglobulinas DVD o anticuerpos con especificidad doble seleccionados entre cualquiera de los miembros descritos con anterioridad. Las preparaciones de anticuerpos descritas con anterioridad pueden ser útiles para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson, las lesiones en la médula espinal, la lesión cerebral traumática, la esclerosis múltiple, la lesión nerviosa periférica, la esquizofrenia, la depresión, la ansiedad, y también las enfermedades citadas con anterioridad, relacionadas con la plasticidad y el crecimiento de las neuritas, y la neurotoxicidad.

Los anticuerpos de esta solicitud también pueden combinarse con péptidos que permiten la transferencia trans-membrana para incluir el direccionamiento hacia proteínas

blanco intracelulares. Estas secuencias de péptidos pueden incluir, no taxativamente, tat, antenapedia, poli-argininas, algunos péptidos antimicrobianos. Estos péptidos pueden permitir la transferencia a través de las membranas, incluyendo las membranas plasmáticas celulares, y también las membranas epiteliales y endoteliales, incluyendo la barrera hematoencefálica, la mucosa gástrica, las meninges, y otras.

Un anticuerpo o una porción de anticuerpo de esta solicitud también puede administrarse con uno o más agentes terapéuticos adicionales que son moléculas pequeñas útiles para el tratamiento de trastornos donde hay actividad de RGM A, como se describió en los párrafos precedentes. Ha de comprenderse que los anticuerpos de esta solicitud o sus porciones de unión a antígeno pueden usarse solos o en combinación con un agente adicional, por ejemplo, un agente terapéutico, donde dicho agente adicional es seleccionado por aquellos entrenados en la técnica en función del propósito deseado. Por ejemplo, el agente adicional puede ser un agente terapéutico reconocido en la técnica como útil para tratar la enfermedad o condición que se está tratando con el anticuerpo de la presente invención. El agente adicional también puede ser un agente que confiere un atributo benéfico a la composición terapéutica por ejemplo, un agente que afecta la viscosidad de la composición.

7. Composiciones farmacéuticas

En la invención también se proveen composiciones farmacéuticas que comprenden un anticuerpo o una porción de unión de éste al antígeno de la invención, y un vehículo aceptable para el uso farmacéutico. Las composiciones farmacéuticas que comprenden los anticuerpos de la invención son para usar, no taxativamente, en el diagnóstico, la detección o el monitoreo de un trastorno, en la prevención, el tratamiento, el manejo o el alivio de un trastorno, o uno o más de sus síntomas, y/o en la investigación. En una realización específica, una composición comprende uno o más anticuerpos de la invención de la invención. En otra realización, la composición farmacéutica comprende uno o más anticuerpos de la invención, y uno o más agentes profilácticos o terapéuticos distintos de los anticuerpos de la invención, para tratar un trastorno donde la actividad de RGM A es perjudicial. Preferiblemente, los agentes profilácticos o terapéuticos conocidos como útiles para, o aquellos que han sido o que estén siendo usados en la prevención, el tratamiento, el manejo o el alivio de un trastorno o uno o más de sus síntomas. De acuerdo con estas realizaciones, la composición además puede comprender un transportador, diluyente o excipiente.

Los anticuerpos y las porciones de anticuerpo de la invención pueden incorporarse en composiciones farmacéuticas apropiadas para la administración a un sujeto. En general, la composición farmacéutica comprende un anticuerpo o una porción de anticuerpo de la invención, y un vehículo aceptable para el uso farmacéutico. Tal como lo

se usa en la presente documentación, un "vehículo aceptable para el uso farmacéutico" incluye cualquiera de los solventes, los medios de dispersión, los recubrimientos, los agentes antibacterianos y antifúngicos, los agentes isotónicos y los agentes que demoran de absorción, y semejantes, que sean compatibles con el uso fisiológico. Entre los

5 ejemplos de vehículos aceptables para el uso farmacéutico se incluyen uno o más de los siguientes: agua, solución salina, solución salina amortiguada con fosfato, dextrosa, glicerol, etanol y semejantes, así como combinaciones de éstos. En muchos casos, en la composición será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes, tales como manitol, sorbitol o cloruro de sodio. Además, los vehículos

10 aceptables para el uso farmacéutico pueden comprender pequeñas cantidades de sustancias auxiliares, tales como agentes de humectación o emulsionantes, preservantes o soluciones amortiguadoras, que mejoran la vida útil o la eficacia de un anticuerpo o la porción de anticuerpo.

Se conocen distintos sistemas de liberación que pueden usarse para administrar

15 uno o más anticuerpos de la invención, o la combinación de uno o más anticuerpos de la invención, y un agente profiláctico o un agente terapéutico útil para prevenir, manejar, tratar o aliviar un trastorno, o uno o más de sus síntomas, por ejemplo, la encapsulación en liposomas, micropartículas, microcápsulas, las células recombinantes capaces de expresar el anticuerpo o el fragmento de anticuerpo, la endocitosis mediada por

20 receptores (véase, por ejemplo, Wu y Wu, *J. Biol. Chem.* 262:4429-4432 (1987)), la construcción de un ácido nucleico como parte de un vector retroviral o de otro tipo, etcétera. Entre los métodos de administración de un agente profiláctico o terapéutico de la invención se incluyen, no taxativamente, la administración parenteral (por ejemplo, intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa y subcutánea), la administración

25 epidural, la administración intratumoral, y la administración a través de la mucosa (por ejemplo, por la ruta intranasal y oral). Además, puede emplearse la administración pulmonar, por ejemplo, mediante el uso de un inhalador o un nebulizador, y la formulación con un agente para una aplicación en aerosol. Véanse, por ejemplo, las Patentes de los EEUU N° 6019968, 5985320, 5985309, 5934272, 5874064, 5855913, 5290540 y

30 4880078; y las Publicaciones PCT N° WO 92/19244, WO 97/32572, WO 97/44013, WO 98/31346 y WO 99/66903, cada una de las cuales se incorpora en su totalidad en la presente documentación a modo de referencia. En una realización, se administra un anticuerpo de la invención, una terapia combinada o una composición de la invención usando la tecnología de liberación pulmonar de drogas Alkermes AIR® (Alkermes, Inc.,

35 Cambridge, Mass.). En una realización específica, los agentes profilácticos o terapéuticos de la invención se administran en forma intramuscular, intravenosa, intratumoral, oral, intranasal, pulmonar o subcutánea. Los agentes profilácticos o terapéuticos pueden

administrarse por cualquier ruta apropiada, por ejemplo, por infusión o inyección en bolo, por absorción a través del revestimiento epitelial o mucocutáneo (por ejemplo, mucosa oral, rectal y mucosa intestinal, etc.), y pueden administrarse en combinación con otros agentes con actividad biológica. La administración puede ser sistémica o local.

- 5 En una realización específica, puede ser deseable administrar los agentes profilácticos o terapéuticos de la invención en forma local en el área que sea necesario tratar. Esto puede llevarse a cabo, por ejemplo y no taxativamente, por infusión local, por inyección, o por medio de un implante, donde dicho implante está compuesto por un material poroso o no poroso que incluye membranas o matrices, tales como membranas de silastic, polímeros, matrices fibrosas (por ejemplo, Tisseel), o matrices de colágeno. En 10 una realización, se administra una cantidad eficaz de uno o más anticuerpos antagonistas de la invención en forma local en el área afectada de un sujeto, para prevenir, tratar, manejar y/o aliviar un trastorno o un síntoma de éste. En otra realización, se administra una cantidad eficaz de uno o más anticuerpos de la invención en forma local en el área 15 afectada, en combinación con una cantidad eficaz de una o más terapias (por ejemplo, uno o más agentes profilácticos o terapéuticos) diferentes de un anticuerpo de la invención a un sujeto, para prevenir, tratar, manejar y/o aliviar un trastorno o uno o más de sus síntomas.

- En otra realización, el agente profiláctico o terapéutico puede liberarse en un 20 sistema de liberación controlada o liberación sostenida. En una realización, puede usarse una bomba para obtener la liberación controlada o sostenida (véanse Langer, *supra*; Sefton, 1987, *CRC Crit. Ref. Biomed. Eng.* 14:20; Buchwald *et al.*, 1980, *Surgery* 88:507; Saudek *et al.*, 1989, *N. Engl. J. Med.* 321:574). En otra realización, pueden usarse materiales poliméricos para efectuar la liberación controlada o sostenida de las terapias 25 de la invención (véanse, por ejemplo, *Medical Applications of Controlled Release*, Langer y Wise (editores), CRC Pres., Boca Raton, FL (1974); *Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance*, Smolen y Ball (editores), Wiley, Nueva York (1984); Ranger y Peppas, 1983, *J. Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem.* 23:61; véanse también Levy *et al.*, 1985, *Science* 228:190; During *et al.*, 1989, *Ann. Neurol.* 25:351; Howard *et al.*, 1989, *J. Neurosurg.* 71:105); la Patente de los EEUU N° 5679377; la Patente de los 30 EEUU N° 5916597; la Patente de los EEUU N° 5912015; la Patente de los EEUU N° 5989463; la Patente de los EEUU N° 5128326; la Publicación PCT N° WO 99/15154; y la Publicación PCT N° WO 99/20253. Entre los ejemplos de polímeros usados en las formulaciones de liberación sostenida, se incluyen, no taxativamente, poli(2- 35 hidroxietilmetacrilato), poli(metilmetacrilato), poli(ácido acrílico), poli(etilen-co-vinilacetato), poli(ácido metacrílico), poliglicólidos (PLG), polianhídridos, poli(N-vinilpirrolidona), poli(alcohol vinílico), poli(acrilamida), poli(etilenglicol), poliláctidos (PLA), poli(láctido-co-

glicólidos) (PLGA), y poliortoésteres. En una realización preferida, el polímero usado en una formulación de liberación es inerte, está libre de impurezas lixiviables, es estable en almacenamiento, estéril y biodegradable. En aún otra realización, puede colocarse un sistema de liberación controlada o sostenida en la proximidad de un blanco profiláctico o terapéutico, de modo que se requiera solamente una fracción de la dosis sistémica (véase, por ejemplo, Goodson, en *Medical Applications of Controlled Release*, citado con anterioridad, volumen 2, páginas 115-138 (1984)).

Los sistemas de liberación controlada se describen en la revisión de Langer (1990, *Science* 249:1527-1533). Es posible usar cualquier procedimiento conocido por aquellos entrenados en la técnica para producir formulaciones de liberación sostenida que comprendan uno o más agentes terapéuticos de la invención. Véanse, por ejemplo, la Patente de los EEUU N° 4526938, la Publicación PCT WO 91/05548, la Publicación PCT WO 96/20698, Ning *et al.*, 1996, "Intratumoral Radioimmunotherapy of a Human Colon Cancer Xenograft Using a Sustained-Release Gel", *Radiotherapy & Oncology* 39:179-189, Song *et al.*, 1995, "Antibody Mediated Lung Targeting of Long-Circulating Emulsions", *PDA Journal of Pharmaceutical Science & Technology* 50:372-397, Cleek *et al.*, 1997, "Biodegradable Polymeric Carriers for a bFGF Antibody for Cardiovascular Application", *Pro. Int'l. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater.* 24:853-854, y Lam *et al.*, 1997, "Microencapsulation of Recombinant Humanized Monoclonal Antibody for Local Delivery", *Proc. Int'l. Symp. Control Rel. Bioact. Mater.* 24:759- 760, las cuales se incorporan en su totalidad en la presente documentación a modo de referencia.

En una realización específica, cuando la composición de la invención es un ácido nucleico que codifica un agente profiláctico o terapéutico, el ácido nucleico puede administrarse *in vivo* para promover la expresión del agente profiláctico o terapéutico que codifica si se lo construye como parte de un vector de expresión de ácidos nucleicos apropiado y se lo administra de modo de que se torne intracelular, por ejemplo, con el uso de un vector retroviral (véase la Patente de los EEUU N° 4980286), por inyección directa, usando un bombardeo de micropartículas (por ejemplo, una pistola génica; Biolistic, Dupont) o un recubrimiento con lípidos o receptores superficiales celulares o agentes de transfección, o administrándolo en combinación con un péptido semejante a homeobox del que se sepa que ingresa al núcleo (véase, por ejemplo, Joliot *et al.*, 1991, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:1864-1868). Como alternativa, un ácido nucleico puede introducirse en forma intracelular e incorporarlo en el ADN de la célula huésped para la expresión por recombinación homóloga.

Una composición farmacéutica de la invención se formula para que sea compatible con la ruta de administración que se pretenda de él. Entre los ejemplos de rutas de administración, se incluyen, no taxativamente, la administración parenteral, por ejemplo,

90
96

intravenosa, intradérmica, subcutánea, oral, intranasal (por ejemplo, por inhalación), transdérmica (por ejemplo, tópica), transmucosal, y rectal. En una realización específica, la composición se formula de acuerdo con los procedimientos de rutina, como una composición farmacéutica adaptada para la administración intravenosa, subcutánea, intramuscular, oral, intranasal o tópica a sujetos humanos. En general, las composiciones para administración intravenosa son soluciones en soluciones acuosas isotónicas estériles. Cuando resulta necesario, la composición también puede incluir un agente solubilizante y un anestésico local, tal como lignocamne, para calmar el dolor en el sitio de la inyección.

Si las composiciones de la invención son para administrar en forma tópica, las formulaciones pueden formularse en forma de una pomada, una crema, un parche transdérmico, una loción, un gel, un champú, un atomizado, un aerosol, una solución, una emulsión, u otra forma bien conocida por aquellos entrenados en la técnica. Véase, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, e Introduction to Pharmaceutical Dosage Forms, 19^a edición, Mack Pub. Co., Easton, Pa. (1995). Para las formas de dosificación tópica no atomizables, generalmente se emplean formas entre viscosas y semisólidas o sólidas, que comprenden un vehículo o uno o más excipientes compatibles con la aplicación tópica, y que tienen una viscosidad dinámica preferiblemente mayor que el agua. Entre las formulaciones apropiadas se incluyen, no taxativamente, soluciones, suspensiones, emulsiones, cremas, pomadas, polvos, linimentos, bálsamo, y semejantes, que son, se desea, esterilizados o mezclados con agentes auxiliares por ejemplo, preservantes, estabilizadores, agentes de humectación, amortiguadores o sales) para afectar distintas propiedades, tales como, por ejemplo, la presión osmótica. Entre otras formas de dosificación tópica apropiadas, se incluyen las preparaciones en aerosol atomizables, donde el principio activo, preferiblemente en combinación con un vehículo inerte sólido o líquido, se envasa en una mezcla con un compuesto volátil presurizado (por ejemplo, un propelente gaseoso, tal como freón) o en una botella comprimida. Si se lo desea, también pueden agregarse hidratantes o humectantes a las composiciones farmacéuticas y las formas de dosificación. Los ejemplos de dichos ingredientes adicionales son bien conocidos en la técnica.

Si el método de la invención comprende la administración intranasal de una composición, la composición puede formularse en una forma en aerosol, atomizado, vapor, o en forma de gotas. En particular, los agentes profilácticos o terapéuticos para usar de acuerdo con la presente invención pueden liberarse convenientemente en forma de una presentación de atomizador de aerosol en un envase presurizado o un nebulizador, con el uso de un propelente apropiado (por ejemplo, diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluoroetano, dióxido de carbono u otro gas apropiado). En

el caso de aerosol presurizado, la unidad de dosificación puede determinarse incluyendo una válvula para proporcionar una cantidad medida. Las cápsulas y los cartuchos (compuestos, por ejemplo, por gelatina) pueden formularse para usar en un inhalador o un insuflador que contenga una mezcla del polvo del compuesto con una base de polvo apropiada, tal como lactosa o almidón.

Si el método de la invención comprende la administración oral, las composiciones pueden formularse por vía oral en forma de tabletas, cápsulas, sellos, cápsulas de gelatina, soluciones, suspensiones, y semejantes. Las tabletas o las cápsulas pueden prepararse por medios convencionales, con agentes excipientes aceptables para el uso farmacéutico, tales como agentes unión (por ejemplo, almidón de maíz pregelatinizado, polivinilpirrolidona o hidroxipropilmetilcelulosa); rellenos (por ejemplo, lactosa, celulosa microcristalina o fosfato ácido de calcio); lubricantes (por ejemplo, estearato de magnesio, talco o sílice); desintegrantes (por ejemplo, almidón de papa o glicolato sódico de almidón); o agentes de humectación (por ejemplo, laurilsulfato de sodio). Las tabletas pueden recubrirse de acuerdo con métodos bien conocidos en la técnica. Las preparaciones líquidas para la administración oral pueden tomar la forma de soluciones, jarabes o suspensiones, no taxativamente, o pueden presentarse como un producto seco para la reconstitución con agua u otro vehículo apropiado antes de usarlas. Dichas preparaciones líquidas pueden prepararse por medios convencionales, con aditivos aceptables para el uso farmacéutico, tales como agentes de suspensión (por ejemplo, jarabe de sorbitol, derivados de celulosa, o grasas comestibles hidrogenadas); agentes emulsionantes (por ejemplo, lecitina o acacia); vehículos no acuosos (por ejemplo, aceite de almendras, ésteres oleosos, alcohol etílico o aceites vegetales fraccionados); y preservantes (por ejemplo, metil o propil-p-hidroxibenzoatos o ácido sórbico). Las preparaciones también pueden contener sales amortiguadoras, agentes saborizantes, colorantes y edulcorantes, según sea apropiado. Las preparaciones para la administración oral pueden formularse en una forma apropiada para la liberación lenta, la liberación controlada o la liberación sostenida de uno o varios agentes profilácticos o terapéuticos.

El método de la invención puede comprender la administración pulmonar, por ejemplo, con el uso de un inhalador o un nebulizador, de una composición formulada con un agente para la aplicación en aerosol. Véanse, por ejemplo, las Patentes de los EEUU N° 6019968, 5985320, 5985309, 5934272, 5874064, 5855913, 5290540 y 4880078; y las Publicaciones PCT N° WO 92/19244, WO 97/32572, WO 97/44013, WO 98/31346 y WO 99/66903, las cuales se incorporan en su totalidad en la presente documentación a modo de referencia. En una realización específica, se administra un anticuerpo de la invención, una terapia combinada y/o una composición de la invención usando la tecnología de liberación de drogas pulmonar Alkermes AIR® (Alkermes, Inc., Cambridge, Mass.).

El método de la invención puede comprender la administración de una composición formulada para la administración parenteral por inyección (por ejemplo, por inyección en bolo o infusión continua). Las formulaciones para inyección pueden presentarse en forma de dosificaciones individuales (por ejemplo, en ampollas o envases para dosis múltiples) con la adición de un preservante. Las composiciones pueden tomar formas tales como suspensiones, soluciones o emulsiones en vehículos oleosos o acuosos, y pueden contener agentes de formulación tales como agentes de suspensión, estabilizadores y/o dispersantes. Como alternativa, el principio activo puede tomar la forma de un polvo para reconstituir con un vehículo apropiado (por ejemplo, agua estéril libre de pirógenos) antes de usarlo. Además, los métodos de la invención pueden comprender la administración de composiciones formuladas como preparaciones de depósito. Dichas formulaciones de acción prolongada pueden administrarse por implantación (por ejemplo, en forma subcutánea o intramuscular) o por inyección intramuscular. De este modo, por ejemplo, las composiciones pueden formularse con materiales poliméricos o hidrofóbicos apropiados (por ejemplo, como una emulsión en un aceite aceptable) o resinas de intercambio iónico, o como derivados moderadamente solubles (por ejemplo, como una sal moderadamente soluble).

Los métodos de la invención abarcan la administración de composiciones formuladas como formas neutras o salinas. Entre las sales aceptables para el uso farmacéutico se incluyen aquellas formadas con aniones, tales como aquellos derivados de ácido clorhídrico, fosfórico, acético, oxálico, tartárico, etcétera, y aquellos formados con cationes, tales como aquellos derivados de sodio, potasio, amonio, calcio, hidróxidos férricos, isopropilamina, trietilamina, 2-etilamino etanol, histidina, procaína, etcétera.

Por lo general, los ingredientes de las composiciones se proveen en forma separada o mezclados en una unidad de forma de dosificación, por ejemplo, como un polvo liofilizado seco o un concentrado libre de agua en un recipiente sellado herméticamente, tal como una ampolla o un saché donde se indica la cantidad de agente activo. En los casos en que el modo de administración sea la infusión, la composición podrá administrarse con una botella de infusión que contenga agua o solución salina estéril de grado farmacéutico. En los casos en que el modo de administración sea por inyección, podrá proveerse una ampolla de agua o solución salina estéril para la inyección, de modo que los ingredientes puedan mezclarse antes de la administración.

En particular, en la invención también se provee uno o más de los agentes profilácticos o terapéuticos, o composiciones farmacéuticas de la invención envasadas en un recipiente sellado herméticamente, tal como una ampolla o saché donde se indica la cantidad del agente. En una realización, uno o más de los agentes profilácticos o terapéuticos, o las composiciones farmacéuticas de la invención, se proveen como un

polvo liofilizado estéril seco o concentrado, libre de agua, en un recipiente sellado herméticamente que puede reconstituirse (por ejemplo, con agua o solución salina) para obtener la concentración apropiada para administrarlo a un sujeto. Con preferencia, uno o más de los agentes profilácticos o terapéuticos, o las composiciones farmacéuticas de la invención, se proveen como un polvo liofilizado estéril seco en un recipiente sellado herméticamente, con una dosificación individual de al menos 5 mg, más preferiblemente al menos 10 mg, al menos 15 mg, al menos 25 mg, al menos 35 mg, al menos 45 mg, al menos 50 mg, al menos 75 mg, o al menos 100 mg. Los agentes profilácticos o terapéuticos liofilizados o las composiciones farmacéuticas de la invención deben almacenarse a una temperatura de entre 2°C y 8°C en su recipiente original, y los agentes profilácticos o terapéuticos, o las composiciones farmacéuticas de la invención deben administrarse una semana, con preferencia 5 días, 72 horas, 48 horas, 24 horas, 12 horas, 6 horas, 5 horas, 3 horas o una hora después de reconstituirse. En una realización alternativa, uno o más de los agentes profilácticos o terapéuticos, o las composiciones farmacéuticas de la invención, se proveen en forma líquida en un recipiente sellado herméticamente en el que se indica la cantidad y la concentración del agente. Con preferencia, la forma líquida de la composición que se administra se provee en un recipiente sellado herméticamente que contiene al menos 0,25 mg/ml, más preferiblemente al menos 0,5 mg/ml, al menos 1 mg/ml, al menos 2,5 mg/ml, al menos 5 mg/ml, al menos 8 mg/ml, al menos 10 mg/ml, al menos 15 mg/kg, al menos 25 mg/ml, al menos 50 mg/ml, al menos 75 mg/ml o al menos 100 mg/ml. La forma líquida debe almacenarse a una temperatura de entre 2°C y 8°C en su recipiente original.

Los anticuerpos y las porciones de anticuerpos de la invención pueden incorporarse en de una composición farmacéutica apropiada para la administración parenteral. Con preferencia, el anticuerpo o las porciones de anticuerpo se prepararán como una solución inyectable con entre 0,1 y 250 mg/ml de anticuerpo. La solución inyectable puede estar compuesta por una forma de dosificación líquida o liofilizada en un recipiente, una ampolla o una jeringa de color sílex o ámbar llenada con antelación. La solución amortiguadora puede ser L-histidina (entre 1 y 50 mM), óptimamente entre 5 y 10 mM, a pH entre 5,0 y 7,0 (óptimamente a pH 6,0). Entre otras soluciones amortiguadoras apropiadas, se incluyen, no taxativamente, el succinato de sodio, el citrato de sodio, el fosfato de sodio o el fosfato de potasio. Puede usarse cloruro de sodio para modificar la toxicidad de la solución, en una concentración de entre 0 y 300 mM (óptimamente 150 mM para una forma de dosificación líquida). Pueden incluirse crioprotectores para una forma de dosificación liofilizada, principalmente sacarosa en una proporción de entre 0 y 10% (óptimamente entre 0,5 y 1,0%). Entre otros crioprotectores apropiados, se incluye la trehalosa y la lactosa. Pueden incluirse agentes de carga para una forma de dosificación

liofilizada, principalmente manitol en una proporción de entre 1 y 10% (óptimamente entre 2 y 4%). Pueden usarse estabilizadores para las formas de dosificación líquidas y liofilizadas, principalmente L-Metionina entre 1 y 50 mM (óptimamente entre 5 y 10 mM). Entre otros agentes de carga apropiados, se incluye la glicina, la arginina, que pueden incluirse como polisorbato-80 en una proporción de entre 0 y 0,05% (óptimamente entre 0,005 y 0,01%). Entre los agentes tensioactivos adicionales, se incluyen, no taxativamente, el polisorbato 20 y los agentes tensioactivos BRIJ. La composición farmacéutica que comprende los anticuerpos y las porciones de anticuerpos de la invención, que se preparan como una solución inyectable para administración parenteral, puede comprender además un agente útil como coadyuvante, tal como los que se usan para incrementar la absorción o la dispersión de una proteína terapéutica (por ejemplo, un anticuerpo). En particular, un adyuvante útil es la hialuronidasa, tal como Hylenex® (hialuronidasa recombinante humana). La adición de hialuronidasa a la solución inyectable mejora la biodisponibilidad para los humanos después de la administración parenteral, particularmente la administración subcutánea. También permite obtener un volumen mayor por sitio de inyección (es decir, más de 1 ml), con menos dolor y disconformidad, y con una incidencia mínima de reacciones en el sitio de inyección (véase WO2004078140, US2006104968, incorporadas en la presente documentación a modo de referencia).

Las composiciones de esta invención pueden tomar una variedad de formas. Éstas incluyen, por ejemplo, las formas de dosificación líquidas, semisólidas y sólidas, tales como las soluciones líquidas (por ejemplo, las soluciones inyectables y para infusión), las dispersiones o las suspensiones, las tabletas, las píldoras, los polyos, los liposomas y los supositorios. La forma preferida depende del modo de administración y la aplicación terapéutica requerida. Las composiciones preferidas típicas toman la forma de soluciones inyectables o para infusión, tales como composiciones similares a las que se usan para la inmunización pasiva de seres humanos con otros anticuerpos. El modo de administración preferido es el parenteral (por ejemplo, intravenoso, subcutáneo, intraperitoneal, intramuscular). En una realización preferida, el anticuerpo se administra mediante infusión o inyección intravenosa. En otra realización preferida, el anticuerpo se administra mediante inyección intramuscular o subcutánea.

Las composiciones terapéuticas típicamente deben ser estériles y estables bajo las condiciones de fabricación y almacenamiento. La composición puede formularse como una solución, una microemulsión, una dispersión, un liposoma u otra estructura ordenada, apropiada para alojar una concentración elevada de droga. Las soluciones inyectables estériles pueden prepararse mediante la incorporación del compuesto activo (es decir, anticuerpo o porción de anticuerpo) en la cantidad requerida en un solvente apropiado con

uno o una combinación de ingredientes de los que se enumeraron previamente, según se lo requiera, a lo que sigue una esterilización por filtración. Por lo general, las dispersiones se preparan mediante la incorporación del compuesto activo en un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básico y los otros ingredientes que necesarios
5 enumerados con anterioridad. En el caso de los polvos estériles y los liofilizados para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos de preparación preferidos son el secado por vacío y el secado por rociado, que proporciona un polvo del ingrediente activo, más cualquier ingrediente adicional que se desee, a partir de una solución de éste previamente esterilizada por filtración. La fluidez apropiada de una solución puede
10 mantenerse, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento, tal como la lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de una dispersión, y mediante el uso de agentes tensioactivos. Es posible obtener la absorción prolongada de composiciones inyectables mediante la inclusión en la composición de un agente que demore la absorción, por ejemplo, sales de monoestearato y gelatina.

15 Los anticuerpos y las porciones de anticuerpos de la presente invención pueden administrarse mediante una variedad de métodos conocidos en la técnica, aunque para muchas aplicaciones terapéuticas, la ruta/el modo de administración preferido es la inyección subcutánea, la inyección intravenosa o la infusión. Como han de apreciar aquellos entrenados en la técnica, la ruta y/o el modo de administración variarán
20 dependiendo de los resultados que se deseen. En ciertas realizaciones, el compuesto activo puede prepararse con un vehículo que protegerá el compuesto de la liberación rápida, tal como una formulación de liberación controlada, incluyendo implantes, parches transdérmicos y sistemas de administración microencapsulados. Pueden usarse
25 polímeros biodegradables, biocompatibles, tales como acetato de viniltileno, polianhídridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres y ácido poliláctico. Muchos métodos para la preparación de dichas formulaciones están patentados o generalmente son conocidos por aquellos entrenados en la técnica. Véase, por ejemplo, *Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems*, J.R. Robinson, editor, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1978.

30 En determinadas realizaciones, un anticuerpo o un porción de anticuerpo de la invención puede administrarse por vía oral, por ejemplo, con un diluyente inerte o un vehículo comestible asimilable. El compuesto (y otros ingredientes, si se lo desea) también puede envasarse en una cápsula de gelatina de cubierta dura o blanda, puede comprimirse en tabletas, o puede incorporarse directamente en la dieta del sujeto. Para la
35 administración terapéutica oral, los compuestos pueden incorporarse con excipientes y usarse en la forma de tabletas para ingestión, tabletas bucales, comprimidos, cápsulas, elixires, suspensiones, jarabes, obleas, y semejantes. Para administrar un compuesto de

la invención por una ruta distinta que la administración parenteral, puede ser necesario recubrir el compuesto, o coadministrar el compuesto, con un material para prevenir su inactivación.

5 También pueden incorporarse compuestos activos suplementarios en las composiciones. En determinadas realizaciones, un anticuerpo o porción de anticuerpo de la invención se coformula y/o se coadministra con uno o más agentes terapéuticos adicionales que son útiles para tratar trastornos en los que es perjudicial la actividad de RGM A. Por ejemplo, un anticuerpo o porción de anticuerpo anti-RGM A de la invención puede coformularse y/o coadministrarse con uno o más anticuerpos adicionales que se
10 unen a otros blancos (por ejemplo, anticuerpos que se unen a citoquinas o se unen a moléculas de la superficie de la célula). Más aun, uno o más anticuerpos de la invención pueden usarse en combinación con dos o más de los agentes terapéuticos mencionados con anterioridad. Ventajosamente, en dichas terapias de combinación pueden utilizarse dosis menores de los agentes terapéuticos que se administran, con lo que se evitan
15 posibles toxicidades o complicaciones asociadas con las distintas monoterapias.

En determinadas realizaciones, un anticuerpo contra RGM A o un fragmento de éste está unido a un vehículo extensor de la vida media conocido en la técnica. Dichos vehículos incluyen, no taxativamente, el dominio Fc, polietilenglicol y dextrano. Dichos vehículos se describen, por ejemplo, en la Solicitud de los EEUU con N° de Acta
20 09/428082 y la Solicitud PCT N° WO 99/25044, las cuales se incorporan en la presente documentación para todo propósito.

En una realización específica, se administran secuencias de ácidos nucleicos que comprenden secuencias de nucleótidos que codifican un anticuerpo de la invención u otro agente profiláctico o terapéutico de la invención, para tratar, prevenir, manejar o mejorar
25 un trastorno o uno o más de sus síntomas mediante terapia génica. La terapia génica hace referencia a la terapia que se lleva a cabo mediante la administración a un sujeto de un ácido nucleico expresado o que puede ser expresado. En esta realización de la invención, los ácidos nucleicos producen el anticuerpo o el agente profiláctico o terapéutico de la invención codificado, que produce un efecto profiláctico o terapéutico.

30 Es posible usar cualquiera de los métodos de terapia génica disponibles en la técnica de acuerdo con la presente invención. Para hallar revisiones generales de los métodos de terapia génica, véanse Goldspiel et al., 1993, *Clinical Pharmacy* 12:488-505; Wu y Wu, 1991, *Biotherapy* 3:87-95; Tolstoshev, 1993, *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 32:573-596; Mulligan, *Science* 260:926-932 (1993); y Morgan y Anderson, 1993, *Ann. Rev. Biochem.* 62:191-217; Mayo, 1993, *TIBTECH* 11(5):155-215. Los métodos
35 comúnmente conocidos en la técnica para la tecnología de ADN recombinante que pueden usarse se describen en Ausubel et al. (editores), *Current Protocols in Molecular*

Biology, John Wiley & Sons, Nueva York (1993); y Kriegler, Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual, Stockton Press, Nueva York (1990). Se presenta una descripción detallada de los distintos métodos de terapia génica en US20050042664 A1, que se incorpora en la presente documentación como referencia.

5 RGM A tiene una función clave en la patología asociada con una variedad de las enfermedades definidas con anterioridad. Se ha establecido que las proteínas RGM A y RGM se hallan reguladas positivamente en los sitios de las lesiones, en seres humanos que sufren lesiones cerebrales traumáticas (Schwab et al., Arch. Neurol. 62: 1561-8, 2005a), en la penumbra infartada y las áreas nucleares del cerebro de los seres humanos
10 que han sufrido daños debido a un accidente cerebrovascular (Schwab et al., Arch. Neurol. 62: 1561-8, 2005a), y en la sustancia negra de los pacientes que sufren la enfermedad de Parkinson (Bossers et al. Brain Pathology vol. 19: 91-107, 2008). Entonces, los anticuerpos contra RGM A son agentes apropiados para la terapia de combinación del accidente cerebrovascular, las lesiones cerebrales traumáticas, la
15 enfermedad de Parkinson, la enfermedad de Alzheimer, y otros trastornos neurodegenerativos del sistema nervioso humano. En los pacientes que han sufrido un accidente cerebrovascular, el tratamiento actual, que se aplica durante las primeras tres horas, consiste en la administración de un activador del plasminógeno tisular para lisar los coágulos sanguíneos (Liang et al. Arch. Neurol. 65: 1429-33, 2008), y en principio, este
20 tratamiento podría combinarse con la administración de un anticuerpo contra RGM A, para ofrecer un abordaje de tratamiento diferente y una ventana terapéutica mucho más extendida. En la enfermedad de Alzheimer, es posible realizar una combinación de drogas con los anticuerpos contra RGM A, por ejemplo, con los potenciadores de la cognición donepezil y memantina, y este abordaje podría permitir reducir significativamente la neuropatología progresiva. La administración intranasal de insulina tiene efectos positivos
25 sobre la atención y la memoria (Hanson y Frey, BMC Neurosci. 9: S5, 2008), y constituye una ruta de administración posible para los anticuerpos contra RGM A que permite evitar la barrera hematoencefálica. En los pacientes con la enfermedad de Parkinson (PD), el tratamiento actual se basa en agentes dopaminérgicos, tales como la levodopa, una prodroga de la dopamina (Khor y Hsu, Curr. Clin. Pharmacol. 2: 234-43, 2007), el ropinirol, un agonista no ergolínico de la dopamina (Jost et al. J. Neurol. 255 Supl. 5: 60-3, 2008), y los inhibidores de la monoamina oxidasa B rasagilina y selegilina (Elmer y Bertoni, Expert Opin. Pharmacother. 9: 2759-72, 2008). A pesar de sus efectos beneficiosos sobre la PD temprana y leve, ninguna de estas drogas permite prevenir la degeneración progresiva de
30 la sustancia negra y las áreas subcorticales y corticales asociadas del cerebro, por lo que una terapia de combinación con anticuerpos contra RGM A estimuladores de la regeneración podría demorar el progreso de la enfermedad.

Cualquier agente neuroprotector, ya sea un antioxidante, un capturador de radicales, una droga anticonvulsiva como la fenitoína, o la droga contra la anemia eritropoyetina, será apropiado para la terapia de combinación con anticuerpos contra RGM A que favorezcan la regeneración, lo que permitirá extender la ventana de tratamiento terapéutico de los neuroprotectores, que usualmente es muy breve.

Los anticuerpos y las porciones de anticuerpos de la invención pueden usarse para tratar aquellos seres humanos que sufren las enfermedades mencionadas.

Ha de comprenderse que los anticuerpos de la invención, o sus porciones de unión a antígeno, pueden usarse solos o en combinación con un agente adicional, por ejemplo, un agente terapéutico, donde dicho agente adicional es seleccionado por aquellos entrenados en la técnica en función del propósito deseado. Por ejemplo, el agente adicional puede ser un agente terapéutico reconocido en la técnica como útil para tratar la enfermedad o la condición que se esté tratando con el anticuerpo de la presente invención. El agente adicional también puede ser un agente que le imparta un atributo beneficioso a la composición terapéutica, por ejemplo, un agente que afecte la viscosidad de la composición.

Adicionalmente, ha de comprenderse que las combinaciones que se incluyen dentro de esta invención son aquellas combinaciones útiles para el propósito que se pretende de ellas. Los agentes que se indicarán más adelante se presentan con propósitos ilustrativos, y no tienen por objeto limitar la invención. Las combinaciones que son parte de esta invención pueden comprender los anticuerpos de la presente invención y al menos un agente adicional elegido entre las listas que se presentarán más adelante. La combinación también puede incluir más de un agente adicional, por ejemplo, dos o tres agentes adicionales, si la combinación es tal que la composición formada puede llevar a cabo la función que se esté buscando.

Los ejemplos no limitativos para la esclerosis múltiple con los cuales puede combinarse un anticuerpo o una porción de anticuerpo de la invención incluyen los siguientes: corticosteroides; prednisolona; metilprednisolona; azatioprina; ciclofosfamida; ciclosporina; metotrexato; 4-aminopiridina; tizanidina; interferón- α 1a (AVONAX; Biogen); interferón- α 1b (BETASERON; Chiron/Berlex); interferón α -n3 (Interferon Sciences/Fujimoto), interferón- α (Alfa Wassermann/J&J), interferón α 1A-IF (Serono/Inhale Therapeutics), Peg-interferón α 2b (Enzon/Schering-Plough), copolímero 1 (Cop-1; COPAXONA; Teva Pharmaceutical Industries, Inc.); oxígeno hiperbárico; inmunoglobulina intravenosa; cladribina; anticuerpos o antagonistas de otras citoquinas o factores de crecimiento humanos, y sus receptores, por ejemplo, TNF, LT, IL-1, IL-2, IL-6, IL-7, IL-8, IL-23, IL-15, IL-16, IL-18, EMAP-II, GM-CSF, FGF y PDGF. Los anticuerpos de la invención, o las porciones de unión a antígeno de éstos, pueden combinarse con

anticuerpos contra moléculas de la superficie celular, tales como CD2, CD3, CD4, CD8, CD19, CD20, CD25, CD28, CD30, CD40, CD45, CD69, CD80, CD86, CD90, o sus ligandos. Los anticuerpos de la invención, o las porciones de unión a antígeno de éstos, también pueden combinarse con agentes tales como el metotrexato, la ciclosporina, FK506, la rapamicina, el micofenolato de mofetil, la leflunomida, los NSAID, por ejemplo, el ibuprofeno, los corticosteroides, tales como la prednisolona, los inhibidores de la fosfodiesterasa, los agonistas de la adenosina, los agentes antitrombóticos, los inhibidores del complemento, los agentes adrenérgicos, los agentes que interfieren con la señalización por citoquinas proinflamatorias, tales como TNF α o IL-1 (por ejemplo, inhibidores de las quinasas IRAK, NIK, IKK, p38 o MAP), los inhibidores de la enzima convertidora de IL-1 α , inhibidores de TACE, los inhibidores de la señalización de las células T, tales como los inhibidores de quinasas, los inhibidores de metaloproteínas, la sulfasalazina, la azatioprina, las 6-mercaptopurinas, los inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina, los receptores de citoquinas solubles, y sus derivados (por ejemplo, receptores de TNF p55 o p75 solubles, sIL-1RI, sIL-1RII, sIL-6R), y las citoquinas antiinflamatorias (por ejemplo, IL-4, IL-10, IL-13 y TGF β).

Los ejemplos preferidos de agentes terapéuticos para la esclerosis múltiple con los que puede combinarse el anticuerpo o la porción de unión a antígeno de éste incluyen interferón- γ , por ejemplo, IFN α 1a e IFN α 1b; copaxona, corticosteroides, inhibidores de la caspasa, por ejemplo, inhibidores de la caspasa-1, inhibidores de IL-1, inhibidores de TNF, y anticuerpos contra los ligandos CD40 y CD80.

Los anticuerpos de la invención, o las porciones de unión a antígeno de éstos, también pueden combinarse con agentes tales como alemtuzumab, dronabinol, unimed, daclizumab, mitoxantrona, clorhidrato de xaliproden, fampridina, acetato de glatiramer, natalizumab, sinnabidol, a-inmunoquina NNSO3, ABR-215062, Anergix.MS, antagonistas del receptor de quimioquina, BBR-2778, calagualina, CPI-1189, LEM (mitoxantrona encapsulada en liposomas), THC.CBD (agonista de cannabinoides) MBP-8298, mesopram (inhibidor de PDE4), MNA-715, anticuerpo contra el receptor de anti-IL-6, neurovax, pirfenidone allotrap 1258 (RDP-1258), sTNF-R1, talampanel, teriflunomida, TGF-beta2, tiplimotida, antagonistas de VLA-4 (por ejemplo, TR-14035, VLA4 Ultrahaler, Antegran-ELAN/Biogen), antagonistas del interferón gamma, agonistas de IL-4.

Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden incluir una "cantidad eficaz para el uso terapéutico" o una "cantidad eficaz para el uso profiláctico" de un anticuerpo o porción de anticuerpo de la invención. Una "cantidad eficaz para el uso terapéutico" hace referencia a una cantidad eficaz, en las dosis y durante períodos de tiempo necesarios, para obtener el resultado terapéutico que se desea. Una cantidad eficaz para el uso terapéutico del anticuerpo o la porción de anticuerpo puede ser

determinada por un aquellos entrenados en la técnica y puede variar de acuerdo con factores tales como el estado de la enfermedad, la edad, el sexo y el peso del individuo, y la capacidad del anticuerpo o la porción de anticuerpo de producir una respuesta deseada en el individuo. Una cantidad eficaz para el uso terapéutico también es una en la que cualquier efecto tóxico o perjudicial del anticuerpo o la porción de anticuerpo es superado por los efectos terapéuticos beneficiosos. Una "cantidad eficaz para el uso profiláctico" hace referencia a una cantidad eficaz, a las dosis y durante los periodos de tiempo necesarios, para obtener el resultado profiláctico que se desea. Típicamente, debido a que se usa una dosis profiláctica en los sujetos antes o en estados tempranos de la enfermedad, la cantidad eficaz para el uso profiláctico será menor que la cantidad eficaz para el uso terapéutico.

Los regímenes de dosificación pueden ajustarse para proveer la respuesta deseada óptima (por ejemplo, una respuesta profiláctica o terapéutica). Por ejemplo, puede administrarse un bolo individual, pueden administrarse varias dosis divididas a lo largo del tiempo, o la dosis puede reducirse o incrementarse proporcionalmente según lo indiquen las exigencias de la situación terapéutica. Resulta especialmente ventajoso formular las composiciones parenterales en formas de dosificación individuales para facilitar su administración y obtener dosis uniformes. La forma de dosificación individual, como se la usa en la presente documentación, hace referencia a unidades físicamente discretas, apropiadas para dosificaciones individuales en los sujetos mamíferos a tratar; donde cada unidad contiene una cantidad predeterminada del compuesto activo, calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el vehículo farmacéutico que se requiera. La especificación para la forma de dosificación individual de la invención está dictada y depende directamente de (a) las características únicas del compuesto activo y el efecto terapéutico o profiláctico particular que se desea obtener, y (b) las limitaciones inherentes en la técnica de las composiciones de un compuesto activo tal para el tratamiento de la sensibilidad en los individuos.

A modo de ejemplo, un rango no limitativo para una cantidad eficaz para el uso profiláctico o terapéutico de un anticuerpo o una porción de anticuerpo de la invención es entre 0,1 y 20 mg/kg, más preferiblemente entre 1 y 10 mg/kg. Vale destacar que los valores de las dosis pueden variar con el tipo y la severidad de la condición a tratar. También ha de comprenderse que, para un sujeto en particular, los regímenes de dosificación específicos deben ajustarse con el correr del tiempo, de acuerdo con la necesidad individual y el juicio profesional de la persona que administra o supervisa la administración de las composiciones, y que los rangos de dosificación que se indican en la presente documentación solamente se presentan a modo de ejemplo y no tienen la intención de limitar el alcance o la práctica de la composición que se reivindica.

Para los expertos en la técnica será fácilmente evidente que son obvias otras modificaciones y adaptaciones apropiadas para los métodos de la invención que se describen en la presente documentación, y que dichos métodos también pueden llevarse a cabo usando equivalentes apropiados, sin alejarse del alcance de la invención o las realizaciones que se detallan en la presente documentación. Habiéndose descripto la presente invención en detalle, ésta podrá comprenderse más claramente con referencia a los siguientes ejemplos, que solamente se incluyen con fines ilustrativos y no pretenden limitar la invención.

EJEMPLOS

10 Métodos

Los siguientes métodos describen en detalle los procedimientos experimentales usados en la sección de ejemplos.

(i) Se cubrieron placas de ELISA de unión directa con hRGM A (R&D) en una concentración de 2 µg/ml en amortiguador de carbonato. Se bloquearon luego las cavidades con una solución de Bloqueo 2% (Bio-Rad) durante 1 hora, a temperatura ambiente. Se realizaron diluciones seriadas de los anticuerpos biotinilados con un factor de dilución de 1:5 en BSA/PBS 0,1% a lo largo de la placa, y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente. El reactivo de detección fue una dilución 1:10.000 de estreptavidina-HRP en BSA/PBS al 0,1%. Se realizó la detección con un reactivo TMB, se la detuvo con H₂SO₄ 2N y se leyó la DO a 450 nM.

(ii) Análisis de FACS. Se sometieron los transfectantes estables de las células HEK293 que sobreexpresaban hRGM A o las células BAF3 que sobreexpresan RGM A de rata a una coloración con anticuerpos monoclonales 5F9 o 8D1 no marcados durante más de 15 minutos a 4° en amortiguador de BSA/PBS 0,1%. La detección se llevó a cabo con un anticuerpo IgG PE de ratón anti-rata.

(iii) Ensayos de ELISA en fase sólida para evaluar el anticuerpo monoclonal 5F9 en ensayos de unión de hRGM A-neogenina.

Se cubrieron placas de ELISA (Immuno Plate Cert. Maxi Sorb. F96 NUNC, 439454) durante 1 hora a 37°C con una concentración de 2,5 µg/ml del dominio extracelular de la proteína de neogenina humana con una marca de His (concentración de la solución de reserva: 30 µg/ml). Después de la incubación, se removió la neogenina no unida en 3 pasos de lavado separados con PBS que contenía Tween 20 0,02%. El bloqueo de las placas cubiertas con neogenina se hizo agregando 200 µl por cavidad de una solución de bloqueo de albúmina de suero bovina (BSA) al 3%, PBS, Tween 20 (0,02%). Después de incubar durante 1 hora a 37°C, se removió la solución de bloqueo y se agregó la proteína RGM A completa, o fragmentos de ésta, conjugada con una marca de fc humana, con o sin anticuerpo. En algunos experimentos. Se preincubaron los

anticuerpos con las proteínas hRGM A conjugadas con fc durante 1 hora a temperatura ambiente. Se incubaron las placas cubiertas con neogenina con hRGM A, con o sin anticuerpos, durante 1 hora a 37°C. Después de 3 pasos de lavado con PBS-Tween 20 (0,02%), se incubaron las placas con un anticuerpo marcado con biotina anti-fc humano (1 mg/ml, diluido 1:200 en PBS, que contenía BSA al 0,6%, Tween 20 al 0,02%), catálogo de Jackson ImmunoResearch nº: 709-065-149, durante 1 hora a 37°C. Se removió el anticuerpo no unido mediante 3 pasos de lavado con PBS-Tween 20 (0,02%). Para visualizar la unión del anticuerpo anti-fc marcado con biotina, se agregó un complejo que consistía en estreptavidina-peroxidasa (Roche, cat.# 11089153001), diluido 1:5000 con PBS que contenía BSA al 0,6%, Tween 20 al 0,02%, a lo que siguió una incubación a 37°C durante 1 hora. El complejo de Peroxidasa no unido se removió en los 3 pasos de lavado subsiguientes (PBS-Tween 20 (0,02%), antes de agregar el sustrato de la Peroxidasa (Immuno Pure TMB, Pierce # 34021). La reacción del sustrato se detuvo con H₂SO₄ 2,5 M, 1-30 minutos después de su adición a las cavidades. Se analizaron las placas (determinación de DO) con una longitud de onda de 450 nm, usando un fotómetro Anthos.

(iv) Ensayos de ELISA en fase sólida para evaluar el anticuerpo monoclonal 5F9 en ensayos de unión hRGM A-BMP-4.

Se cubrieron placas de ELISA (Immuno Plate Cert. Maxi Sorb. F96 NUNC, 439454) durante 1 hora a 37°C con una solución que contenía una concentración de 2,5 µg/ml de la proteína BMP-4 recombinante humana (R&D Systems, # 314-BP, Lote # BEM316061). Después de la incubación, se removió la BMP-4 no unida en 3 pasos de lavado separados con PBS que contenía Tween 20 al 0,02%. El bloqueo de las placas cubiertas con BMP-4 se hizo agregando 200 µl por cavidad de una solución de bloqueo de Albúmina de suero bovina (BSA) al 3%, PBS, Tween 20 (0,02%). Después de 1 hora de incubación a 37°C, se removió la solución de bloqueo y se agregó la proteína RGM A completa, o fragmentos de ésta, conjugada con una marca de fc humana, con o sin anticuerpo. En algunos experimentos, se preincubaron los anticuerpos con las proteínas hRGM A conjugadas con fc durante 1 hora a temperatura ambiente. Se incubaron las placas cubiertas con BMP-4 con hRGM A, con o sin anticuerpos, durante 1 hora a 37°C. Después de 3 pasos de lavado con PBS-Tween 20 (0,02%), se incubaron las placas con un anticuerpo marcado con biotina anti-fc humano (1 mg/ml, diluido 1:200 en PBS, que contenía BSA al 0,6%, Tween 20 al 0,02%), catálogo de Jackson ImmunoResearch nº: 709-065-149, durante 1 hora a 37°C. Se removió el anticuerpo no unido mediante 3 pasos de lavado con PBS-Tween 20 (0,02%). Para visualizar la unión del anticuerpo anti-fc marcado con biotina, se agregó un complejo que consistía en estreptavidina-peroxidasa (Roche, cat.# 11089153001), diluido 1:5000 con PBS que contenía BSA AL 0,6%, Tween

20 0,02%, a lo que siguió una incubación a 37°C durante 1 hora. El complejo de Peroxidasa no unido se removió en los subsiguientes 3 pasos de lavado (PBS-Tween 20 (0,02%), antes de agregar el sustrato de la Peroxidasa (Immuno Pure TMB, Pierce # 34021). La reacción del sustrato se detuvo con H₂SO₄ 2,5 M, 1-30 minutos después de su
 5 adición a las cavidades. Se analizaron las placas (determinación de DO) a una longitud de onda de 450 nm usando un fotómetro Anthos.

(v) Ensayos de ELISA en fase sólida para evaluar el anticuerpo monoclonal 5F9 en ensayos de unión hRGM A-BMP-2.

Se cubrieron placas de ELISA (Immuno Plate Cert. Maxi Sorb. F96 NUNC, 439454) durante 1 hora a 37°C con una solución que contenía una concentración de 2,5
 10 µg/ml de la proteína BMP-2 recombinante humana (R&D Systems, # 355-BM, Lote # MSA04). Después de la incubación, se removió la BMP-2 no unida en 3 pasos de lavado separados con PBS que contenía Tween 20 0,02%. El bloqueo de las placas cubiertas con BMP-2 se hizo agregando 200 µl por cavidad de una solución de bloqueo de
 15 Albúmina de suero bovina (BSA) 3%, PBS, Tween 20 (0,02%). Después de 1 hora de incubación a 37°C, se removió la solución de bloqueo y se agregó la proteína RGM A completa, o fragmentos de ésta, conjugada con una marca de fc humana, con o sin anticuerpo. En algunos experimentos, se preincubaron los anticuerpos con las proteínas hRGM A conjugadas con fc durante 1 hora a temperatura ambiente. Se incubaron las
 20 placas cubiertas con BMP-2 con hRGM A, con o sin anticuerpos, durante 1 hora a 37°C. Después de 3 pasos de lavado con PBS-Tween 20 (0,02%), se incubaron las placas con un anticuerpo marcado con biotina anti-fc humano (1 mg/ml, diluido 1:200 en PBS, que contenía BSA al 0,6%, Tween 20 al 0,02%), catálogo de Jackson ImmunoResearch n°: 709-065-149, durante 1 hora a 37°C. Se removió el anticuerpo no unido mediante 3 pasos
 25 de lavado con PBS-Tween 20 (0,02%). Para visualizar la unión del anticuerpo anti-fc marcado con biotina, se agregó un complejo que consistía en estreptavidina-peroxidasa (Roche, cat.# 11089153001), diluido 1:5000 con PBS que contenía BSA AL 0,6%, Tween 20 al 0,02%, a lo que siguió una incubación a 37°C durante 1 hora. El complejo de Peroxidasa no unido se removió en los subsiguientes 3 pasos de lavado (PBS-Tween 20
 30 (0,02%), antes de agregar el sustrato de la Peroxidasa (Immuno Pure TMB, Pierce # 34021). La reacción del sustrato se detuvo con H₂SO₄ 2,5 M, 1-30 minutos después de su adición a las cavidades. Se analizaron las placas (determinación de DO) a una longitud de onda de 450 nm usando un fotómetro Anthos.

(vi) Cultivo de células NTera-2

35 Se obtuvieron células NTera-2 humanas de la Colección Alemana de Microorganismos y Cultivos Celulares (DMSZ, Braunschweig). Se descongelaron reservas congeladas de células NTera-2 indiferenciadas en medio DMEM que contenía suero fetal

104
 HB

bovino al 10% (FBS; JRH Bioscience, Kansas, EEUU) y suero de caballo al 5% (HS; Sigma, Alemania). Se cultivaron las células en frascos de cultivo (Greiner, Alemania) hasta alcanzar 80% de confluencia.

5 Para la diferenciación neuronal, se sembraron las células NTera-2 en una densidad de $2,5 \times 10^6$ células/175 cm² en medio de diferenciación (medio DMEM que contenía 10% de FBS, 5% de HS, 1% de penicilina-estreptomicina, ácido retinoico 10 µM). Se diferenciaron las células durante 3 semanas y se cambió el medio dos veces por semana.

10 Después de la diferenciación, se despegaron las células con tripsina-EDTA, y se las separó en una proporción de 1:6. 48 horas después, se separaron las células neuronales mediante el golpeteo de las células subyacentes. Se transfirieron las células separadas para su agregación en medio nuevo, en frascos de cultivo nuevos en agitación (Corning, EEUU). Se dejó reposar las células NTera-2 diferenciadas para que se agregaran, con una agitación horizontal suave a 37°C, durante 24 horas en medio
15 Neurobasal (Gibco) suplementado con B27 (Gibco), glutamina (Gibco) y penicilina-estreptomicina. Se sembraron los agregados de NTera-2 en una densidad de aproximadamente 20-30 agregados por cubreobjeto, en placas de 24 cavidades. Se cubrieron los cubreobjetos de poli-lisina precubiertos con laminina (20 µg/ml, Sigma) y con el fc recombinante acoplado al fragmento #786 de RGM A humana (aminoácidos 47-168)
20 en una concentración de 10 µg/ml. Después de la siembra, se trataron los cultivos con el anticuerpo monoclonal 5F9, agregado en tres concentraciones diferentes (0,1 µg/ml; 1 µg/ml; 10 µg/ml) al medio de cultivo, y se los incubó nuevamente durante 24 horas a 37°C en medio Neurobasal. A continuación, se fijaron los agregados en paraformaldehído al 4% (2 horas, temperatura ambiente), y se los permeabilizó agregando Triton X-100 al 0,1% en
25 PBS (20 minutos, temperatura ambiente). Para realizar la coloración fluorescente, se bloquearon los cultivos con PBS que contenía BSA al 1% durante 1 hora a temperatura ambiente. Después del bloqueo, las células NTera se incubaron con un anticuerpo monoclonal de ratón contra α -tubulina, isotipo 3 (clon SDL3D10, Sigma # T8660), durante 2 horas a temperatura ambiente. Se removió el anticuerpo no unido mediante 3 pasos de
30 lavado diferentes (5-15 minutos cada uno), y se incubaron las células NTera con un anticuerpo de burro anti-ratón conjugado con Cy-3 (Jackson ImmunoResearch Lote 62597), diluido 1:350 veces en PBS/0,5% de BSA y 0,5 µg/ml de bisbenzimidaz. Después de una incubación de 1 hora, se lavaron los cultivos 3 veces para remover el anticuerpo secundario no unido. Para la microscopía de fluorescencia, se embebieron los
35 cubreobjetos en Fluoromount G (Southern Biotech, Eching).

Se adquirieron imágenes de agregados de NTera-2 usando un microscopio de fluorescencia Zeiss Axiovert 200, y se analizaron automáticamente los productos de los

105
111

cultivos usando un sistema de adquisición y análisis de imágenes interno. El análisis automático del producto fue hecho con Image Pro Plus 4.5 y el análisis estadístico de los datos se realizó con el Graph Pad Prism 4. El producto se normalizó a los cultivos control crecidos en ausencia del fragmento de la RGM A human #786.

5 (vii) Cultivo SH-SY5Y.

Las células SH-SY5Y (ATCC, CRL-2266) son células de neuroblastoma humano derivadas de un tumor de cerebro metastásico. Se cultivaron estas células en un medio que consistía en un 50% de la Solución de Sales Balanceada de Earle (Invitrogen Life Technologies, Cat. # 24010-043) y 50% de la Mezcla de Nutrientes F12 (Ham) +
 10 GlutaMAX-1 (Invitrogen Life Technologies, Cat. # 31765-027). Al medio se le agregó un suplemento adicional de 10% de suero fetal bovino inactivado por calor (FCS, JRH Biosciences, Kansas Cat. # 12107-1000M), 1% de NEAA (Solución de Aminoácidos no esenciales MEM (Sigma-Aldrich Cat.# M1745) y 1% de penicilina (10000 U/ml)/estreptomicina (10000 µg/ml) (Invitrogen Life Technologies, Cat. # 15140-122). Para
 15 estimular la diferenciación neuronal y el crecimiento de las prolongaciones neuronales, se cultivaron las células SH-SY5Y en un medio suplementado con ácido retinoico 10 µM (RA, Sigma-Aldrich Cat. # R2625-050MG) durante varios días. Se cultivaron las células SH-SY5Y diferenciadas en frascos de cultivo de tejidos, se las removi6 con una tripsinización cuidadosa, y se las sembr6 sobre cubreobjetos de vidrio cubiertos con un patr6n de
 20 bandas de la proteína RGM A o de un fragmento de la misma y colágeno I.

(viii) Preparación de cubreobjetos de vidrio con bandas

La versión modificada del ensayo de bandas sobre cubreobjetos de vidrio se realizó en una forma levemente diferente a la descrita previamente (Knoell et al. Nature Protocols 2: 1216-1224, 2007) y se resume a continuación.

25 Se presionaron matrices de silicona estériles para la producción de bandas que consisten en proteínas purificadas sobre la superficie de una placa de Petri con la cara rugosa de la matriz apuntando hacia arriba. Se colocaron cubreobjetos limpios lavados con etanol sobre la matriz, y los bordes de la matriz se marcaron con un bolígrafo en el anverso del cubreobjetos. La matriz que contenía los cubreobjetos se coloc6 boca abajo
 30 cuidadosamente, con el cubreobjetos orientado hacia el fondo de la placa de Petri. Se mezcl6 RGM A inhibitoria completa conjugada con Fc o fragmentos-fc, o RGM A humana recombinante (R&D Systems Cat. # 2459 RM), con 10 µl de un anticuerpo anti-rat6n marcado con FITC (Fab- IgG específico de cabra anti-rat6n, Sigma-Aldrich Cat. # F-4018) para visualizar las bandas de RGM A. Usando una jeringa Hamilton, se inyectaron
 35 cuidadosamente 50 µl de la solución de RGM A-anticuerpo FITC a través del canal de entrada. El exceso de fluido abandon6 la matriz a través del canal de salida, y se elimin6 con un paño Kleenex. Después de una incubaci6n de la matriz-cubreobjetos a 37°C

durante 2 horas, se lavó la primera solución de recubrimiento (que contenía RGM A) con 100 µl de PBS. En el siguiente paso, se transfirieron los cubreobjetos con las bandas de RGM A a una placa de 24 cavidades, cubierta con 500 µl de colágeno I (colágeno I de cola de rata, Becton Dickinson Biosciences Cat. # 354236) para llenar los espacios vacíos entre las bandas de RGM A. y se incubó a 37°C durante 2 horas. Finalmente, se produjo un patrón de bandas alternadas de RGM A y colágeno I sobre el cubreobjetos. Después de la incubación, el colágeno I no unido se lavó mediante tres pasos de lavado separados con PBS, y las células SH-SY5Y diferenciadas se sembraron sobre los cubreobjetos. Se continuó la incubación de las células SH-SY5Y sobre el sustrato estampado a 37°C durante 20-24 horas, en presencia o ausencia de anticuerpos monoclonales dirigidos contra RGM A humana.

Para el análisis de la inmunofluorescencia, se fijaron las células en paraformaldehído al 4% durante 2 horas a temperatura ambiente, o durante la noche a 4°C, y se las permeabilizó por medio de una incubación con PBS que contenía 0,1% de Triton X-100 durante 10-20 minutos a temperatura ambiente. Después de bloquear con BSA al 3% durante 60 minutos, se incubaron las células con el anticuerpo primario (monoclonal anti- α -tubulina, isotipo 3, clon SDL 3D10, Sigma-Aldrich Cat. # T8660) durante 2 horas a temperatura ambiente, y después de varios pasos de lavado, con el anticuerpo secundario (Cy-3 de burro anti-ratón JacksonImmuno Research Lote: 62597), diluido en PBS con BSA al 0,1% durante 1 hora. Los núcleos fueron sometidos a una contracoloración usando bisbenzimidá H33258 (Riedel-De-Haen, Cat. # A-0207). Las células fueron embebidas finalmente en Fluoromount G (Southern Biotechnology Associates Inc.: Cat. # 010001). Se analizaron las células usando un microscopio de fluorescencia Axioplan2 (Zeiss).

25 (ix) Construcción y expresión de anticuerpos recombinantes anti RGM A

Se clonó el ADN que codificaba los fragmentos de ADNc de la región variable de la cadena pesada de los anticuerpos monoclonales de rata anti-RGM A humana 5F9 y 8D1 dentro de un vector de expresión pHybE que contenía la región constante de la IgG1 humana, la cual contiene 2 mutaciones de aminoácidos en la región bisagra, por recombinación homóloga en bacterias. Estas mutaciones son un cambio de leucina por alanina en las posiciones 234 y 235 (numeración EU, Lund et al., 1991, J. Immunol., 147:2657). Se clonó la región variable de la cadena liviana de los anticuerpos monoclonales 5F9 y 8D1 dentro del vector pHybE, que contenía la región constante humana kappa. Los ejemplos de vectores pHyb-E incluyen pHybE-hCk y pHybE-hCg1,z,no-a (véase la Solicitud de Patente de los EEUU con N° de Acta 61/021282). Se expresaron los anticuerpos completos de manera transitoria en células 293E por co-transfección de los ADNc de las cadenas pesada y liviana quiméricas, unidos dentro del

plásmido de expresión pHybE. Los sobrenadantes celulares que contenían al anticuerpo recombinante se purificaron por cromatografía de Proteína A Sefarosa, y el anticuerpo unido se eluyó agregando un amortiguador ácido. Se neutralizaron los anticuerpos y se los dializó en PBS. Posteriormente, se evaluó la capacidad de unirse RGM A de los anticuerpos monoclonales anti- RGM A humana purificados por ELISA, tal como se describió en el ejemplo 1, y ELISA de competición, tal como se describió en el ejemplo 7.

Ejemplo 1: Generación de anticuerpos monoclonales anti RGM A humana

Los anticuerpos monoclonales de rata anti-RGM A humana se obtuvieron como se detalla a continuación:

10 Ejemplo 1A: Inmunización de ratas con el antígeno de RGM A humana

El día 1, se inyectaron veinticinco microgramos de RGM A humana recombinante purificada (R&D Systems Cat#2459-RM lote MRH02511A) mezclados con coadyuvante completo de Freund (Sigma), por vía subcutánea, en cuatro ratas Harlan Sprague Dawley de 6-8 semanas de edad. Los días 21, 42 y 63, se inyectaron veinticinco microgramos de RGM A humana recombinante purificada mezclados con coadyuvante incompleto de Freund (Sigma), por vía subcutánea, en las mismas 4 ratas Harlan Sprague Dawley. El día 144 o el día 165, se inyectaron las ratas por vía intravenosa con 10 µg de RGM A humana recombinante purificada.

Ejemplo 1B: Generación de un hibridoma

Se fusionaron los esplenocitos obtenidos de las ratas inmunizadas descriptas en el ejemplo 1.2.A con células SP2/O-, en una proporción de 2:1, de acuerdo con el método establecido descrito en Kohler, G. y Milstein 1975, Nature, 256:495 para generar hibridomas. Los productos de fusión se sembraron en medio selectivo que contenía azaserina e hipoxantina, en placas de 96 cavidades, en una densidad de 1,5 x 10⁵ células de bazo por cavidad. Siete a diez días después de la fusión, se observaron colonias de hibridomas macroscópicas. Se evaluó el sobrenadante de cada uno de las cavidades que contenían colonias de hibridoma por medio de un ELISA directo (véase el ejemplo 2), para determinar la presencia del anticuerpo contra RGM A humana. Las líneas celulares positivas en el ELISA se evaluaron en FACS contra células HEK293 transfectadas de manera estable donde se expresaba RGM A humana y/o de rata. Después, en estas líneas celulares de hibridoma de rata se evaluó la reactividad con RGM A de rata en un ELISA directo, y también se determinó la unión a la proteína de fusión HuRGM A 47-168 en el ELISA.

Tabla 7. Unión de los anticuerpos monoclonales de rata anti RGM A

Nombre	ELISA directo	FACS	ELISA directo	ELISA directo
	rHuRGM A	HEK293-rhRGM A	rRatRGM A	hRGM A 47-168/HulgGFc

108
114

ML68-8D1	Sí	Sí	No	Sí
ML69-5F9	Sí	Sí	Sí	Sí

Ejemplo 2: Unión de los anticuerpos monoclonales 5F9 y 8D1 en un ELISA directo

Según se ilustra en la Figura 1A, los anticuerpos monoclonales 5F9 y 8D1 se unen a hRGM A con una afinidad similar, tal como describió en la sección anterior (i). También se demostró que el anticuerpo monoclonal 5F9 se une a RGM A de rata en un ELISA, mientras que 8D1 no es capaz de unirse a RGM A de rata (datos no presentados). En la Figura 1B se ilustra que los anticuerpos monoclonales 5F9 y 8D1 se unen a células HEK293 donde se sobreexpresa hRGM A en FACS. En la Figura 1C se ilustra que 5F9 es capaz de unirse a células BAF3 donde se sobreexpresa RGM A de rata en FACS, mientras que 8D1 no lo es. El FACS se llevó a cabo según lo descrito en la sección (ii).

Se usaron ensayos de ELISA en fase sólida para evaluar la unión del anticuerpo monoclonal 5F9 en ensayos de unión competitivos de hRGM A-neogenina. Se prepararon y usaron las placas de ELISA como se describió en la sección (iii) de esta solicitud. Se agregó hRGM A en una concentración de 0,5 µg/ml con anticuerpos 5F9, durante 1 hora a 37°C. Se usó el anticuerpo monoclonal 5F9 en las siguientes concentraciones: 1,25 µg/ml, 0,63 µg/ml, 0,32 µg/ml, 0,16 µg/ml, 0,08 µg/ml, 0,04 µg/ml, 0,02 µg/ml, 0,01 µg/ml. La unión de hRGM A se visualizó usando un anticuerpo anti-fc marcado con biotina y un complejo de estreptavidina-peroxidasa. Se analizaron las placas (determinación de DO) en una longitud de onda de 450 nm, usando un fotómetro Anthos. Como se ilustra en la Figura 2, las tres concentraciones de anticuerpo más altas inhibieron la unión de RGM A humana completa a la neogenina en una forma dependiente de la dosis.

Los ensayos de ELISA en fase sólida también se usaron para evaluar el anticuerpo monoclonal 5F9 en ensayos competitivos de hRGM A-BMP-4. Se prepararon y usaron las placas de ELISA como se describió en la sección (iv) de esta solicitud. Se agregó hRGM A en una concentración de 0,5 µg/ml con anticuerpos 5F9, durante 1 hora a 37°C. Se usó el anticuerpo monoclonal 5F9 en las siguientes concentraciones: 1,25 µg/ml, 0,63 µg/ml, 0,32 µg/ml, 0,16 µg/ml, 0,08 µg/ml, 0,04 µg/ml, 0,02 µg/ml, 0,01 µg/ml. La unión de hRGM A se visualizó usando un anticuerpo anti-fc marcado con biotina y un complejo de estreptavidina-peroxidasa. Se analizaron las placas (determinación de DO) en una longitud de onda de 450 nm usando un fotómetro Anthos. Como se ilustra en la Figura 3, las cuatro concentraciones de anticuerpo más altas, inhibieron la unión de RGM A humana completa a BMP-4 en una forma dependiente de la dosis.

Los ensayos de ELISA en fase sólida se usaron también para evaluar la inhibición de la unión del fragmento 0 (47-168) de hRGM A a BMP-4 con el anticuerpo monoclonal 5F9. Se cubrieron las placas de ELISA durante 1 hora a 37°C con una concentración de 2,5 µg/ml de la proteína BMP-4 humana recombinante. Se agregó la cadena liviana de

ap9
H10

hRGM A (fragmento 0, 47-168) en una concentración de 0,5 µg/ml con anticuerpos 5F9, durante 1 hora a 37°C. Se usó el anticuerpo monoclonal 5F9 en las siguientes concentraciones: 1,25 µg/ml, 0,63 µg/ml, 0,32 µg/ml, 0,16 µg/ml, 0,08 µg/ml, 0,04 µg/ml, 0,02 µg/ml, 0,01 µg/ml. La unión de hRGM A se visualizó usando un anticuerpo anti-fc marcado con biotina y un complejo de estreptavidina-peroxidasa. Se analizaron las placas (determinación de DO) en una longitud de onda de 450 nm usando un fotómetro Anthos. En la Figura 4 se ilustra la inhibición dependiente de la dosis de la unión de la cadena liviana de RGM A humana a BMP-4 con el anticuerpo en concentraciones de 1,25 µg/ml, 0,63 µg/ml y 0,32 µg/ml.

Los ensayos de ELISA en fase sólida se usaron también para evaluar la unión del anticuerpo monoclonal 5F9 en ensayos de unión competitivos de hRGM A-BMP-2. Se prepararon y usaron las placas de ELISA como se describió en la sección (v) de esta solicitud. Se agregó hRGM A completa en una concentración de 0,5 µg/ml con anticuerpos 5F9, durante 1 hora a 37°C. Se usó el anticuerpo monoclonal 5F9 en las siguientes concentraciones: 5 µg/ml, 2,5 µg/ml, 1,25 µg/ml, 0,63 µg/ml. La unión de hRGM A se visualizó usando un anticuerpo anti-fc marcado con biotina y un complejo de estreptavidina-peroxidasa. Se analizaron las placas (determinación de DO) en una longitud de onda de 450 nm usando un fotómetro Anthos. En la Figura 5 se ilustra la inhibición de la unión de RGM A humana completa a BMP-2 con el anticuerpo en concentraciones de 5 µg/ml, 2,5 µg/ml, 1,25 µg/ml, 0,63 µg/ml, 0,32 µg/ml.

Los ensayos de ELISA en fase sólida se usaron también para evaluar a los anticuerpos monoclonales 5F9 y 8D1 en ensayos de unión de hRGM A-neogenina, hRGM A-BMP-2 y hRGM A-BMP-4. (Figura 9) Como se describió con anterioridad, se cubrieron las placas de ELISA durante 1 hora a 37°C con una concentración de 2,5 µg/ml del dominio extracelular de la proteína humana de neogenina marcada con His o con 2,5 µg/ml Bmp-2 o BMP-4. Se agregó hRGM A completa conjugada con fc en una concentración de 0,5 µg/ml con anticuerpos durante 1 hora a 37°C. Los anticuerpos monoclonales 5F9 y 8D1 se usaron en las siguientes concentraciones: 5 µg/ml, 2,5 µg/ml, 1,25 µg/ml, 0,63 µg/ml, 0,32 µg/ml, 0,16 µg/ml, 0,08 µg/ml. La unión de hRGM A se visualizó usando un anticuerpo anti-fc marcado con biotina y un complejo de estreptavidina-peroxidasa. Se analizaron las placas (determinación de DO) en una longitud de onda de 450 nm usando un fotómetro Anthos. Como se ilustra en la Figura 9, el anticuerpo monoclonal 8D1 de rata inhibe o reduce la unión de RGM A humana a BMP-2 y a BMP-4, pero no es capaz de inhibir su unión a la neogenina.

Ejemplo 3. Actividad del anticuerpo monoclonal 5F9 en ensayos de crecimiento de neuritas con agregados de neuronas humanas diferenciadas NTera

710

116

Se obtuvieron células NTera y se las cultivó como se describió en la sección del método (vi) de esta solicitud. El anticuerpo monoclonal 5F9 neutralizó la actividad de inhibición del crecimiento de las neuritas del fragmento inhibidor potente de la cadena liviana de la proteína hRGM A humana conjugada con fc (aminoácidos 47-168) en ensayos de crecimiento de neuritas con agregados de neuronas NTera humanas diferenciadas. Como se ilustra en la Figura 6, en ausencia de una proteína RGM A inhibitoria o un fragmento, y en presencia de la sustancia estimulante de procesos laminina, los agregados neuronales de NTera presentan una red extensa y densa de neuritas en crecimiento (A). Como también se ilustra en la Figura 6, la presencia de la cadena liviana de hRGM A reduce dramáticamente la cantidad, la densidad y la longitud de las neuritas de NTera, con lo que se demuestra la potente actividad de inhibición del fragmento de hRGM A. Las pocas neuritas que salen del agregado son cortas y fuertemente empaquetadas (B). En las partes C-E de la Figura 6 se ilustran concentraciones en aumento del anticuerpo monoclonal 5F9, que al ser agregado a los cultivos, neutraliza o desreprime, de una manera eficaz y dependiente de la dosis, la actividad de inhibición del crecimiento de neuritas del fragmento de la cadena liviana de hRGM A. Al aumentar las concentraciones del anticuerpo monoclonal, el crecimiento de los agregados neuronales de NTera es restaurado por completo, a pesar de la presencia del inhibidor RGM A (C: 0,1 µg/ml del anticuerpo monoclonal 5F9; D: 1 µg/ml del anticuerpo monoclonal 5F9; E: 10 µg/ml del anticuerpo monoclonal 5F9).

Se realizó un análisis cuantitativo de la actividad de neutralización del anticuerpo monoclonal 5F9 en ensayos de crecimiento de neuritas con agregados de NTera humanos para evaluar el fragmento inhibidor potente de la cadena liviana de la proteína hRGM A humana conjugada con fc (aminoácidos 47-168). El crecimiento de procesos de los cultivos fue analizado automáticamente al colorear los agregados con bisbenzimida para luego fotografiarlos. Con la coloración solamente marcaron los agregados, y no las neuritas en crecimiento. Sin embargo, éstas fueron coloreadas con un anticuerpo contra β -3-tubulina y un anticuerpo secundario marcado con un fluoróforo. El crecimiento de las neuritas fue determinado automáticamente calculando el índice de crecimiento de neuritas, un índice determinado mediante la sustracción del área de los cuerpos celulares del área del agregado y sus procesos coloreados con β -3-tubulina. Después, este factor se dividió por el área de los cuerpos celulares, como se describió en Lingor et al. J. Neurochem. 103: 181-189, 2007. En la Figura 7 se ilustra que el anticuerpo monoclonal 5F9 (0,1-10,0 µg) neutralizó de forma dependiente de la dosis la actividad de inhibición del crecimiento de un fragmento inhibidor potente de hRGM A conjugada con fc (fragmento 0, 47-168; 10 µg) en ensayos de crecimiento de neuritas con agregados de NTera humanas.

M
H2

Ejemplo 4: Actividad del anticuerpo monoclonal 5F9 en bandas de hRGM A/colágeno I

I

Se cultivaron y usaron las células SH-SY5Y como se describió en la sección (vii) de esta solicitud. Se prepararon los cubreobjetos de vidrio con bandas de RGM A y colágeno I como se describió en la sección (viii) de esta solicitud. Para los experimentos, se produjo una base con bandas alternadas de hRGM A/colágeno I y colágeno I, de acuerdo con un protocolo descrito en la literatura (Knoell et al. Nature Protocols 2: 1216-1224, 2007). En ausencia del anticuerpo monoclonal 5F9 (A), las células neuronales SH-SY5Y presentan una preferencia clara por la banda de colágeno I, donde más de 90% de las células prefieren las bandas de colágeno I sobre las bandas de hRGM A. Con concentraciones crecientes del anticuerpo monoclonal 5F9, las células neuronales SH-SY5Y prefieren las bandas de hRGM A sobre las bandas de colágeno I (B-E). En la concentración máxima del anticuerpo monoclonal (E), las neuronas SH-SY5Y presentan una preferencia marcada por las bandas de hRGM A, en comparación con las bandas de colágeno I (véase la Figura 8). Esto puede interpretarse como una característica única del anticuerpo monoclonal 5F9, ya que transformó la naturaleza inhibitoria de RGM A en una actividad de atracción. En presencia de concentraciones crecientes de 5F9, las células neuronales prefieren migrar y crecer en un sustrato RGM A, y no sobre un sustrato permisivo como el colágeno I. Una característica única como ésta nunca había sido descrita para un anticuerpo monoclonal.

Ejemplo 5: Construcción de anticuerpos con injertos de CDR

Se injertan las secuencias CDR de las cadenas VH y VL del anticuerpo monoclonal 5F9 (véase la tabla 5 anterior) aplicando métodos convencionales bien conocidos en la técnica, en distintas secuencias de cadenas pesadas y livianas humanas aceptoras. Sobre la base de los alineamientos de las secuencias VH y VL con las secuencias VH y VL del anticuerpo monoclonal 5F9 de la presente invención, se seleccionan las siguientes secuencias humanas conocidas:

- a) VH3-48, VH3-33 y VH3-23, así como las secuencias de unión hJH3, hJH4 y hJH6, para construir secuencias aceptoras de la cadena pesada (de acuerdo con la tabla 3 anterior);
- b) A17 y A18, así como hJK2, para construir secuencias aceptoras de la cadena liviana (de acuerdo con la tabla 4 anterior).

Mediante el injerto de las CDR correspondientes de VH y VL de 5F9 en dichas secuencias aceptoras, se prepararon las siguientes secuencias VH y VL humanizadas y modificadas con injertos de CDR (véase también la tabla 6 anterior): VH 5F9.1-GL, VH 5F9.2-GL, VH 5F9.3-GL, VH 5F9.4-GL, VH 5F9.5-GL, VH 5F9.6-GL, VH 5F9.7-GL y VH 5F9.8-GL; VL 5F9.1-GL, VL 5F9.2-GL y VL 5F9.3-GL.

112
118

Ejemplo 6: Construcción de retromutaciones del marco en anticuerpos con injertos CDR

Para generar retromutaciones del marco en anticuerpos humanizados, se introducen mutaciones en las secuencias de los anticuerpos con injertos de CDR preparados de acuerdo con el ejemplo 5, mediante la síntesis *de novo* del dominio variable, y/o usando cebadores mutagénicos y PCR, y métodos bien conocidos en la técnica. Se construyen distintas combinaciones de retromutaciones, y otras mutaciones para cada uno de los injertos de CDR,, como se indica a continuación.

Para las cadenas pesadas VH 5F9.1-GL, VH 5F9.2-GL y VH 5F9.3-GL se retromutan uno o más de los siguientes residuos de interfase Vernier y VH/VL, como se indica a continuación: V37→I, V48→I, S49→G, y/o R98→K

Para las cadenas pesadas VH 5F9.4-GL, VH 5F9.5-GL y VH 5F9.6-GL se retromutan uno o más de los siguientes residuos de interfase Vernier y VH/VL, como se indica a continuación: V37→I, V48→I, A49→G, R98→K.

Para las cadenas pesadas VH 5F9.7-GL, VH 5F9.8-GL y VH 5F9.9-GL se retromutan uno o más de los siguientes residuos de interfase Vernier y VH/VL, como se indica a continuación: V37→I, V48→I, S49→G.

Las mutaciones adicionales incluyen las que se indican a continuación:

para las cadenas pesadas VH 5F9.1-GL, VH 5F9.2-GL y VH 5F9.3-GL: D88→A,
para las cadenas pesadas VH 5F9.4-GL, VH 5F9.5-GL y VH 5F9.6-GL: Q1→E y
para las cadenas pesadas VH 5F9.7-GL, VH 5F9.8-GL y VH 5F9.9-GL: L5→V.

Para la cadena liviana VL 5F9.1-GL, se retromutan uno o más de los siguientes residuos de interfase Vernier y VH/VL, como se indica a continuación: I2→V, M4→L, Y41→F.

Para la cadena liviana VL 5F9.2-GL, se retromutan uno o más de los siguientes residuos de interfase Vernier y VH/VL, como se indica a continuación: M4→L, R51→L.

Para la cadena liviana VL 5F9.3-GL se retromutan uno o más de los siguientes residuos de interfase Vernier y VH/VL, como se indica a continuación: M4→L, Y41→F.

Ejemplo 7: Construcción y expresión de anticuerpos anti RGM A recombinantes y humanizados

Se co-transfectaron vectores de expresión pHybE que contenían cadenas pesadas y livianas que contenían retromutaciones del marco en células 293-6E para producir anticuerpos humanizados completos de manera transitoria, como se describió en la sección ix anterior. Las mutaciones se introdujeron en secuencias de los anticuerpos con injertos CDR preparadas de acuerdo con el ejemplo 5, mediante la síntesis *de novo* del dominio variable, y/o usando cebadores mutagénicos y PCR, y métodos bien conocidos

en la técnica. Las secuencias de aminoácidos de las regiones VH y VL de los anticuerpos humanizados se detallan en la tabla 8.

Específicamente, las cadenas pesadas:

- 5 VH 5F9.1, VH 5F9.5 y VH 5F9.9 contienen VH 5F9.4-GL con una mutación Q1→E;
VH 5F9.2, VH 5F9.6, VH 5F9.10, VH 5F9.19, VH 5F9.20, VH 5F9.21 y VH 5F9.22
contienen VH 5F9.4-GL con una mutación Q1→E, y las siguientes retromutaciones en los
residuos Vernier y VH/VL de interfase: V37→I, V48→I, A49→G, R98→K;

VH 5F9.3, VH 5F9.7 y VH 5F9.11 contienen VH 5F9.7-GL con una mutación
L5→V;

- 10 VH 5F9.4, VH 5F9.8, VH 5F9.12, VH 5F9.23, VH 5F9.24, VH 5F9.25, y VH 5F9.26
contienen VH 5F9.7-GL con una mutación L5→V, y las siguientes retromutaciones en los
residuos Vernier y VH/VL de interfase: V37→I, V48→I, S49→G.

Las cadenas livianas

- 15 VL 5F9.1, VL 5F9.2, VL 5F9.3 y VL 5F9.4 son idénticas a VL 5F9.1-GL;

VL 5F9.5, VL 5F9.6, VL 5F9.7 y VL 5F9.8 son idénticas a VL 5F9.2-GL;

VL 5F9.9, VL 5F9.10, VL 5F9.11 y VL 5F9.12 son idénticas a VL 5F9.3-GL;

VL 5F9.19 y VL 5F9.23 contienen VL 5F9.2-GL, con las siguientes retromutaciones
en los residuos Vernier y VH/VL de interfase: M4→L, R51→L;

- 20 VL 5F9.20 y VL 5F9.24 contienen a VL 5F9.2-GL con la siguiente retromutación en
el residuo Vernier y VH/VL de interfase: M4→L;

VL 5F9.21 y VL 5F9.25 contienen VL 5F9.3-GL, con las siguientes retromutaciones
en los residuos Vernier y VH/VL de interfase: M4→L, Y41→F;

VL 5F9.22 y VL 5F9.26 contienen VL 5F9.3-GL, con la siguiente retromutación en
el residuo Vernier y VH/VL de interfase: M4→L.

114
120

Tabla 8: Expresión de anticuerpos humanizados

SEQ ID Nº	Región de la proteína	Secuencia
		123456789012345678901234567890
47	VH h5F9.1	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAA SGFTFS NYGMN WVRQAPGKGLEW V AMIYYDSSEKHYADSVKGR FTISR DNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC A RGTTTPDY WGQGTMTVSS
44	VL h5F9.1	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASIS CRS SQSLEYSDGYTFLEW YLQKPGQSP QLLI YEVSNRFS GVDPDRFSGSGSG TDFTLKISRVEAEDVGVYYC FQATH DPLTFGQGT KLEIKR
48	VH h5F9.2	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAA SGFTFS NYGMN WIRQAPGKGLEW G MIYYDSSEKHYADSVKGR FTISR DNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC A KGTTTPDY WGQGTMTVSS
44	VL h5F9.2	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASIS CRS SQSLEYSDGYTFLEW YLQKPGQSP QLLI YEVSNRFS GVDPDRFSGSGSG TDFTLKISRVEAEDVGVYYC FQATH DPLTFGQGT KLEIKR
49	VH h5F9.3	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAA SGFTFS NYGMN WVRQAPGKGLEW V SMIYYDSSEKHYADSVKGR FTISR DNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC A KGTTTPDY WGQGTMTVSS
44	VL h5F9.3	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASIS CRS SQSLEYSDGYTFLEW YLQKPGQSP QLLI YEVSNRFS GVDPDRFSGSGSG TDFTLKISRVEAEDVGVYYC FQATH DPLTFGQGT KLEIKR

Ms
121

50	VH h5F9.4	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAA SGFTFS NYGMN WIRQAPGKGLEWI GMIYYDSSEKHYADSVKGRFTISR DNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC AKG TTPDY WGQGTMTVSS
44	VL h5F9.4	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCRS SQSLEYSDGYTFLEW YLQKPGQSP QLLI EVSNRFS GVDPDRFSGSGSG TDFTLKISRVEAEDVGVYYCF QATH DPLTF GQGGTKLEIKR
47	VH h5F9.5	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAA SGFTFS NYGMN WVRQAPGKGLEW VAMIIYDSSEKHYADSVKGRFTISR DNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC AR GTPDY WGQGTMTVSS
45	VL h5F9.5	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRS SQSLEYSDGYTFLEW FQQRPGQS PRRLI EVSNRFS GVDPDRFSGSGS GTDFTLKISRVEAEDVGVYYCF QAT HDPLTF GQGGTKLEIKR
48	VH h5F9.6	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAA SGFTFS NYGMN WIRQAPGKGLEWI GMIYYDSSEKHYADSVKGRFTISR DNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC AKG TTPDY WGQGTMTVSS
45	VL h5F9.6	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRS SQSLEYSDGYTFLEW FQQRPGQS PRRLI EVSNRFS GVDPDRFSGSGS GTDFTLKISRVEAEDVGVYYCF QAT HDPLTF GQGGTKLEIKR
49	VH h5F9.7	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAA SGFTFS NYGMN WVRQAPGKGLEW VSMIIYDSSEKHYADSVKGRFTISR DNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC AKG TTPDY WGQGTMTVSS

116
122

45	VL h5F9.7	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRS SQSLEYSDGYTFLEWFQQRPGQS PRRLIYEVSNRFSGVPDRFSGSGS GTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQAT HDPLTFGQGGTKLEIKR
50	VH h5F9.8	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAA SGFTFSNYGMNWIRQAPGKGLEWI GMIYYDSSEKHYADSVKGRFTISR DNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC AKGTTDPDYWGQGTMTVSS
45	VL h5F9.8	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRS SQSLEYSDGYTFLEWFQQRPGQS PRRLIYEVSNRFSGVPDRFSGSGS GTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQAT HDPLTFGQGGTKLEIKR
47	VH h5F9.9	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAA SGFTFSNYGMNWVRQAPGKGLEW VAMIYYDSSEKHYADSVKGRFTISR DNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC ARGTTDPDYWGQGTMTVSS
46	VL h5F9.9	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRS SQSLEYSDGYTFLEWYLQKPGQSP QLLIYEVSNRFSGVPDRFSGSGSG TDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQATH DPLTFGQGGTKLEIKR
48	VH h5F9.10	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAA SGFTFSNYGMNWIRQAPGKGLEWI GMIYYDSSEKHYADSVKGRFTISR DNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC AKGTTDPDYWGQGTMTVSS
46	VL h5F9.10	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRS SQSLEYSDGYTFLEWYLQKPGQSP QLLIYEVSNRFSGVPDRFSGSGSG TDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQATH DPLTFGQGGTKLEIKR

117
123

49	VH h5F9.11	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAA SGFTFS NYGMN WVRQAPGKGLEW VSMIYYDSSEKHYADSVKGRFTISR DNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC AKG TTPDY WGQGTMTVSS
46	VL h5F9.11	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRS SQSLEYSDGYTFLEW YLQKPGQSP QLLIY EVSNRFS GVDPDRFSGSGSG TDFTLKISRVEAEDVGVYYCF QATH DPLTF GQGTKLEIKR
50	VH h5F9.12	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAA SGFTFS NYGMN WIRQAPGKGLEWI GMIYYDSSEKHYADSVKGRFTISR DNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC AKG TTPDY WGQGTMTVSS
46	VL h5F9.12	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRS SQSLEYSDGYTFLEW YLQKPGQSP QLLIY EVSNRFS GVDPDRFSGSGSG TDFTLKISRVEAEDVGVYYCF QATH DPLTF GQGTKLEIKR
48	VH h5F9.19	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAA SGFTFS NYGMN WIRQAPGKGLEWI GMIYYDSSEKHYADSVKGRFTISR DNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC AKG TTPDY WGQGTMTVSS
51	VL h5F9.19	DVVLTSPLSLPVTLGQPASISCRS SQSLEYSDGYTFLEW FQQRPGQS PRLLIY EVSNRFS GVDPDRFSGSGS GTDFTLKISRVEAEDVGVYYCF QAT HDPLTF GQGTKLEIKR
48	VH h5F9.20	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAA SGFTFS NYGMN WIRQAPGKGLEWI GMIYYDSSEKHYADSVKGRFTISR DNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC AKG TTPDY WGQGTMTVSS

118
124

52	VL h5F9.20	DVVLTSQSPSLPVTLGQPASISCRS SQSLEYSDGYTFLEWFQQRPGQS PRRLIYEVSNRFSGVPDRFSGSGS GTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQAT HDPLTFGQGTKLEIKR
48	VH h5F9.21	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAA SGFTFSNYGMNWIRQAPGKGLEWI GMIYYDSSEKHYADSVKGRFTISR DNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC AKGTTDPDYWGQGTMTVSS
53	VL h5F9.21	DVVLTSQSPSLPVTLGQPASISCRS SQSLEYSDGYTFLEWFLQKPGQSP QLLIYEVSNRFSGVPDRFSGSGSG TDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQATH DPLTFGQGTKLEIKR
48	VH h5F9.22	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAA SGFTFSNYGMNWIRQAPGKGLEWI GMIYYDSSEKHYADSVKGRFTISR DNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC AKGTTDPDYWGQGTMTVSS
54	VL h5F9.22	DVVLTSQSPSLPVTLGQPASISCRS SQSLEYSDGYTFLEWYLQKPGQSP QLLIYEVSNRFSGVPDRFSGSGSG TDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQATH DPLTFGQGTKLEIKR
50	VH h5F9.23	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAA SGFTFSNYGMNWIRQAPGKGLEWI GMIYYDSSEKHYADSVKGRFTISR DNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC AKGTTDPDYWGQGTMTVSS
51	VL h5F9.23	DVVLTSQSPSLPVTLGQPASISCRS SQSLEYSDGYTFLEWFQQRPGQS PRRLIYEVSNRFSGVPDRFSGSGS GTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQAT HDPLTFGQGTKLEIKR

719
125

50	VH h5F9.24	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAA SGFTFS NYGMN WIRQAPGKGLEWI GMIYYDSSEKHYADSVKGRFTISR DNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC AKG TTPDY WGQGTMTVSS
52	VL h5F9.24	DVVLTSPLSLPVTLGQPASISCRS SQSLEYSDGYTFLEW FQQRPGQS PRRLI EVSNRFS GVDPDRFSGSGS GTDFTLKISRVEAEDVGVYYC FQAT HDPLTF GQGGTKLEIKR
50	VH h5F9.25	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAA SGFTFS NYGMN WIRQAPGKGLEWI GMIYYDSSEKHYADSVKGRFTISR DNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC AKG TTPDY WGQGTMTVSS
53	VL h5F9.25	DVVLTSPLSLPVTLGQPASISCRS SQSLEYSDGYTFLEW FLQKPGQSP QLLI EVSNRFS GVDPDRFSGSGSG TDFTLKISRVEAEDVGVYYC FQATH DPLTF GQGGTKLEIKR
50	VH h5F9.26	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAA SGFTFS NYGMN WIRQAPGKGLEWI GMIYYDSSEKHYADSVKGRFTISR DNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC AKG TTPDY WGQGTMTVSS
54	VL h5F9.26	DVVLTSPLSLPVTLGQPASISCRS SQSLEYSDGYTFLEW YLQKPGQSP QLLI EVSNRFS GVDPDRFSGSGSG TDFTLKISRVEAEDVGVYYC FQATH DPLTF GQGGTKLEIKR

Ejemplo 8: Caracterización de los anticuerpos humanizados 5F9 usando un ELISA de competición

5 Se cubrieron placas de ELISA (Costar 3369) durante la noche a 4°C con 50 µl por cavidad de hRGM A, a razón de 0,25 µg/ml en amortiguador de carbonato-bicarbonato de sodio 0,2 M, pH 9,4; se las lavó con amortiguador de lavado (PBS que contenía Tween 20 al 0,1%), y se las bloqueó durante 1 hora a temperatura ambiente con 200 µl/cavidad de

120
126

leche en polvo descremada al 2% en PBS. Después de lavar con amortiguador de lavado, se agregó una mezcla de 5F9 quimérica biotinilada (con una concentración final de 0,1 µg/ml) y un anticuerpo competidor de ensayo no marcado, donde se comenzó en una concentración final de 50 µg/ml y se realizaron diluciones seriadas al 5º) en 50 µl/cavidad del amortiguador de ELISA por duplicado. Después de incubar 1 hora a temperatura ambiente y lavar con amortiguador de lavado, los anticuerpos unidos a las placas se detectaron usando 100 µl/cavidad de una dilución 1:10.000 de estreptavidina conjugada con HRP (Fitzgerald) en amortiguador de ELISA. Después de incubar 1 hora a temperatura ambiente y lavar con amortiguador de lavado, se reveló el color agregando 100 µl/cavidad de amortiguador TMB (Zymed). Después de 15 minutos de incubación a temperatura ambiente, se detuvo el revelado del color agregando de 50 µl/cavidad de ácido clorhídrico 1 N. Se leyó la absorbancia a 490 nm.

En la tabla 9 se detallan los valores de IC₅₀ de los anticuerpos 5F9 humanizados obtenidos usando el programa computacional GraphPad Prism (GraphPad Software Inc., San Diego, CA).

Tabla 9. Valores de IC₅₀ de los anticuerpos 5F9 humanizados en un ELISA competitivo

Anticuerpo	IC50 (µg/ml)	Anticuerpo	IC50 (µg/ml)
h5F9.1	>10	h5F9.19	N/D
h5F9.2	>10	h5F9.20	>2,0
h5F9.3	>10	h5F9.21	0,60
h5F9.4	>10	h5F9.22	>2,0
h5F9.5	>10	h5F9.23	0,55
h5F9.6	>10	h5F9.24	1,32
h5F9.7	>10	h5F9.25	0,66
h5F9.8	>10	h5F9.26	>2,0
h5F9.9	>10		
h5F9.10	>10		
h5F9.11	>10		
h5F9.12	>10		

Ejemplo 9: Determinaciones de la afinidad de los anticuerpos quiméricos y humanizados usando la tecnología BIAcore

121
127

El ensayo de BIACORE (Biacore, Inc, Piscataway, NJ) permite determinar la afinidad de los anticuerpos con mediciones cinéticas de las constantes de afinidad y disociación. Se determinó la unión de anticuerpos contra RGM A humana recombinante purificados mediante mediciones basadas en resonancia de plasmón superficial, con un
5 instrumento Biacore® 3000 (Biacore® AB, Uppsala, Suecia), usando HBS-EP continuo (HEPES 10 mM [pH 7,4], NaCl 150 mM, EDTA 3 mM y agente tensioactivo P20 al 0,005%) a 25°C. Todos los reactivos se obtuvieron en Biacore® AB (Uppsala, Suecia). Se inmovilizaron directamente aproximadamente 5000 RU de IgG de cabra anti-humana, (Fc $\square$), el fragmento específico del anticuerpo policlonal (Pierce Biotechnology Inc,
10 Rockford, IL) diluido en acetato de sodio 10 mM (pH 4,5), a través de un chip biosensor CM5 de grado de investigación, usando un conjunto de elementos convencional para la asociación de aminas, de acuerdo con las instrucciones del fabricante, y procedimientos a 25 μ g/ml. Las fracciones no reactivas sobre la superficie del biosensor fueron bloqueadas con etanolamina. Como superficie de reacción, se usó una superficie de carboximetil dextrano modificado en las celdas de flujo 2 y 4. El carboximetil dextrano no modificado sin IgG de cabra anti-humana en las celdas de flujo 1 y 3 se usó como superficie de
15 referencia. Los anticuerpos purificados se diluyeron en solución salina bufereada HEPES, para la captura a través de superficies de reacción específicas para IgG de cabra anti-humana. Se inyectaron los anticuerpos humanos para capturarlos como ligandos (25 μ g/ml) sobre las matrices de reacción con una velocidad de flujo de 5 μ l/min. Se determinaron las constantes de velocidad de asociación y disociación, k_{on} (unidad $M^{-1}s^{-1}$) y k_{off} (unidad s^{-1}), bajo una velocidad de flujo continua de 25 μ l/minuto. Las constantes de velocidad se obtuvieron realizando mediciones cinéticas de unión a diez concentraciones de antígeno diferentes en el rango de entre 0,39 y 50 nM. Para el análisis cinético, se
25 ajustaron las ecuaciones de velocidad derivadas del modelo de unión 1:1 de Langmuir, de manera simultánea con las fases de asociación y disociación de las ocho inyecciones (usando el análisis de ajuste global), con el uso del programa informático Biaevaluation 4.0.1. A continuación, se calculó la constante de equilibrio de disociación (unidad M) de la reacción entre los anticuerpos humanizados y la RGM A humana recombinante purificada, a partir de las constantes cinéticas de velocidad, a través de la siguiente fórmula: $K_D =$
30 k_{off}/k_{on} .

Tabla 9: Afinidad de los Anticuerpos Monoclonales anti-RGM A quiméricos y humanizados

Nombre	k_{on} (1/M•s)	k_{off} (1/s)	K_D (nM)
5F9 quimérico	$7,65 \times 10^5$	$2,36 \times 10^{-3}$	3,09
h5F9.21	$3,55 \times 10^5$	$2,69 \times 10^{-3}$	7,59

122
128

h5F9.23	5,07x10 ⁵	2,21x10 ⁻³	4,37
h5F9.25	5,70x10 ⁵	3,29x10 ⁻³	5,78

Ejemplo 10: Los anticuerpos humanizados 5F9 neutralizan la actividad quimiorrepulsiva de RGM A humana en un ensayo de quimiotaxis de las SH-SY5Y neuronales

5 En el ensayo de quimiotaxis se mide el comportamiento quimiotáctico de las células en respuesta a factores difusibles que pueden ejercer actividades quimioattractantes o quimiorrepulsivas. RGM A ha sido descripta como una proteína que actúa tanto en su forma unida a membrana (repulsión dependiente de contacto) como en su forma soluble y difundible (quimiorrepulsiva), y por lo tanto, se la evaluó en un ensayo

10 quimiotáctico de hRGM A. Con este objetivo, se usaron células SH-SY5Y de neuroblastoma sensibles a RGM A humana que presentaban el receptor de RGM neogenina (Schaffar et al. J. Neurochemistry: 107: 418-431, 2008). Se cultivaron las células SH-SY5Y en solución salina balanceada de Earle/medio F12 (EBSS/F12) suplementado con suero fetal bovino al 10% y aminoácidos no esenciales al 1% (MEM-

15 NEAA). Las células se cultivaron para inducir el crecimiento de neuritas en un medio suplementado con ácido retinoico 10 µM (RA). 5-6 horas después, se tripsinizaron las células y se las contó para sembrarlas en recámaras de Boyden de 24-cavidades (BD Falcon 351185, HTS Sistema Multicavidades). Se agregaron 500 µl de la suspensión celular (que correspondieron a 1x10⁵ células) al círculo interno de cada cavidad. Este

20 círculo interno se encuentra separado del círculo externo mayor de cada cavidad por una membrana PET con un diámetro del poro de 8 µm. Se pipetearon 600 µl de medio +/- RGM A +/- anticuerpos en el círculo externo, y se cultivaron las células en las recámaras de cavidades múltiples de Boyden durante la noche a 37°C. Después de la incubación, se aspiró el medio y se lo reemplazó por el fijador (paraformaldehído al 2%). La fijación

25 continuó durante 2 horas a temperatura ambiente, y después de varios pasos de lavado con PBS, se realizó la permeabilización usando PBS con Triton-X-100 al 0,1% (15 minutos, temperatura ambiente). Las células se colorearon incubándolas 1 hora en la oscuridad, en una solución de Alexa Fluor 488 Faloidina 1:100 (Invitrogen A12379) y Bisbenzimida (H332456) 1: 100. Después de 2 pasos de lavado con PBS, se llenaron los

30 cultivos de PBS, se los selló con parafilm y se los almacenó en la oscuridad para realizar un análisis con un microscopio de fluorescencia (Zeiss Axiovert).

En ausencia de hRGM A, las células migran a través de los poros de la membrana, y pueden ser contadas después de la fijación y la coloración. Solamente se cuentan aquellas células que se encuentran unidas al fondo de la membrana, debido a que estas

35 células han migrado a través de la membrana PET. Las células del lado superior de la

123
124

membrana fueron removidas cuidadosamente antes del procedimiento de fijación. Con este ensayo de quimiotaxis se comprobó que la presencia de hRGM A reducía significativamente, más de 80%, la cantidad de células SH-SY5Y que migran a través de la membrana. El anticuerpo monoclonal de rata 5F9, el anticuerpo quimérico humano-de rata 5F9 y el anticuerpo humanizado 5F9, pero no un anticuerpo monoclonal control de isotipo de rata (p21), neutralizaron parcial o completamente la actividad quimiorrepulsiva de hRGM, manifestada como una gran cantidad de células presentes en el fondo de la membrana (Figura 10), A en una concentración de 10 µg/ml.

Ejemplo 11: 5F9 induce la regeneración de axones del nervio óptico comprimidos y dañados en un modelo de lesión del nervio óptico en rata

El modelo de compresión del nervio óptico (o lesión del nervio óptico) provee un modelo animal para evaluar varias sustancias que estimulan la regeneración de las fibras del nervio óptico y reducen la muerte celular masiva de las células ganglionares de la retina.

Los experimentos se llevaron a cabo en ratas Sprague Dawley macho adultas y ratas Wistar macho, obtenidas en los laboratorios Charles River (D) (Alemania). Los animales se mantienen individualmente en jaulas con un ciclo de 12 horas luz/oscuridad, con agua y comida *ad libitum*. La compresión del nervio óptico se realiza siempre solamente en el ojo izquierdo, mediante una mínima cirugía anterior. Este es un método de lesión del nervio óptico mínimamente invasivo, y fue desarrollado por los inventores, de acuerdo con métodos de cirugía visual anterior humana. Antes y durante los procedimientos de operación, los animales son anestesiados con una anestesia por inhalación, usando Sevoflurano (Abbott GmbH Co. y KG, Delkenheim, Alemania), y son fijados sobre la mesa de operaciones usando una agarradera y cinta adhesiva para los miembros. Se previene la disminución en la temperatura corporal montando los animales sobre una almohadilla de calefacción. Para realizar la cirugía de compresión anterior del nervio óptico de la rata, se libera el ojo izquierdo de los ligamentos y el tejido conectivo de forma cuidadosa. Como primer paso, se realiza un corte de microcirugía (2-3 mm) en el tejido adyacente en la esquina exterior del ojo. Después, se expone el nervio óptico usando un par de fórceps para mover al costado los músculos oculares y la glándula lacrimal, de forma que su uso sea moderado. En el siguiente paso, se abren longitudinalmente las meninges usando microtijeras para exponer el nervio óptico.

Esto resulta en una mayor movilidad del ojo y permite la rotación lateral del ojo y el acceso al nervio óptico izquierdo. El nervio óptico es lesionado aproximadamente 1-3 mm detrás del ojo, usando un par de fórceps dispuestos para proveer una presión máxima fija durante 20-30 segundos. Se tiene especial cuidado de no dañar el suministro vascular del ojo.

Administración local de anticuerpos y amortiguador

Una vez realizada la lesión por compresión del nervio óptico, se trataron ratas macho Sprague Dawley localmente con el anticuerpo 5F9 (n = 10 animales), el anticuerpo control 8D1 (n = 10 animales) o el vehículo control PBS (n = 10 animales). Los experimentadores desconocieron los distintos grupos de tratamiento en todo momento. Para la aplicación local de los anticuerpos, se embebieron pequeños trozos de gelfoam (longitud: 2,5 mm, ancho: 2,5 mm, altura: 2,5 mm) con 20 µl de una solución de anticuerpo, a razón de 10 mg/ml, o con 20 µl de PBS, y se los colocó en una posición directamente adyacente al sitio de la lesión del nervio óptico. Después de realizar una mínima cirugía invasiva y aplicar el anticuerpo, se colocaron los animales sobre toallas de papel en la jaula limpia montada sobre el calentador, para controlar la temperatura corporal hasta que comenzaran a moverse. Se aplicó un ungüento que contenía un antibiótico (Gentamytex, Dr. Mann Pharma) sobre el ojo para evitar las infecciones bacterianas y secar la parte exterior de la esclerótica. Se aplicó Carprofen (Rimadyl, 5 mg/kg, Pfizer GmbH, Karlsruhe) por vía intraperitoneal para la terapia de dolor posoperatorio, directamente después de la cirugía, y posteriormente dos veces por día durante un período de 3 días. Se observaron y se controlaron los animales regularmente, de manera directa, varias horas después de la cirugía, y en los días subsiguientes, para asegurar que todos los animales hubieran sobrevivido y se hubieran recuperado de la anestesia y la cirugía. 5 semanas después de la cirugía y la aplicación del anticuerpo/vehículo, se anestesiaron los animales con una sobredosis de Narcoren (40-60 mg/kg) y se los prefundió inyectando una solución de paraformaldehído al 4% en el corazón. Se aislaron los nervios ópticos y se los transfirió a una solución de paraformaldehído al 4% durante 1 hora a temperatura ambiente, para asegurar una fijación correcta del tejido. Después de la postfijación, se almacenaron los nervios ópticos de las ratas durante la noche en una solución de sacarosa al 30% (4°C). Al día siguiente, se embebieron los nervios ópticos en Tissue Tek y se prepararon secciones congeladas y longitudinales con un espesor de 16 µm usando un crióstato.

Para las inmunocoloraciones, se fijaron las secciones de nervios ópticos con acetona fría (-20°C, 10 minutos), se las lavó 3 veces (5 minutos) con solución salina amortiguada con Tris (TBS, Fluka 93312), y se los bloqueó y se los permeabilizó con TBS que contenía albúmina de suero bovina al 5% y Triton-X-100 al 1% (30 minutos) a temperatura ambiente. Se removió la BSA y el detergente residual mediante 2 pasos de lavado separados con TBS (5 minutos cada uno). Se incubaron las secciones durante 1 hora a temperatura ambiente con un anticuerpo policlonal de conejo anti-GAP-43 (Abcam, ab 7562), sometido a una dilución 1:100 en solución de BSA/TBS al 5%. Después de 3 pasos de lavado con TBS y Tween al 0,1%, se incubaron las secciones durante 1 hora a

125
131

temperatura ambiente con un anticuerpo secundario de cabra anti-conejo conjugado con Alexa Fluor 488 (Molecular Probes A11034), diluido 1: 1000 en BSA/TBS al 5%, que contenía una dilución 1:100 de bisbenzimidá (H33258, 50 µg/ml), para visualizar los núcleos celulares. Antes del embebido, se lavaron 3 veces las secciones coloreadas con
 5 TBS-Tween al 0,1% (5 minutos cada paso), y con agua destilada. Las secciones fueron embebidas en Fluoromount G, se las cubrió con un cubreobjeto y se las almacenó en la oscuridad para el análisis microscópico.

Usando un microscopio de fluorescencia Zeiss, se registraron imágenes (Figura 11) de las secciones longitudinales coloreadas usando el programa informático Zeiss
 10 Axiovision. Cada una de las imágenes de cada nervio fue montada para su análisis usando el programa de análisis de imágenes Photoshop (Adobe). Se realizó un análisis cuantitativo de dos formas diferentes usando imágenes compuestas de los nervios ópticos. Se midió el área positiva para GAP-43 en el sitio de la lesión usando el programa Axiovision (Figura 12B). Independientemente de este primer análisis cuantitativo, se contó
 15 cada una de las fibras en regeneración (positivas para GAP-43) en 4 áreas diferentes: 0-200 µm, 200-400 µm, 400-600 µm y 600-1200 µm más allá del sitio de compresión. El análisis de los datos y la evaluación estadística fueron realizados con la ayuda del programa Graphpad Prism. (Figura 12A)

Administración sistémica de anticuerpos y amortiguador

20 Para la administración sistémica de anticuerpos, se trataron ratas macho Wistar de manera sistémica (por vía intraperitoneal, ip, o intravenosa, iv) con el anticuerpo 5F9 (n = 10 animales), o con PBS como vehículo control (n = 10 animales). Se inyectaron los animales dos veces, y las inyecciones se aplicaron en el día 0, poco tiempo después de la inducción de la compresión del nervio, y el día 21 posterior a la compresión. Las dosis de
 25 anticuerpo aplicaran fueron de 2 mg/kg el día 0 y 10 mg/kg el día 21. Los animales fueron sacrificados cinco semanas después de la lesión por compresión, se aisló el tejido, se prepararon las secciones y las coloraciones, y se realizó el análisis cuantitativo como se describió con anterioridad. Al igual que los experimentos anteriores, los experimentadores desconocieron los grupos de tratamiento en todo momento. En la Figura 13 se presentan
 30 imágenes compuestas de los nervios ópticos de las ratas. En los animales tratados con 5F9 (A), muchas fibras positivas para GAP-43 se extienden más allá del sitio de compresión, en contraste con los animales control tratados con PBS (B). El sitio de compresión está ubicado en el margen izquierdo, y las fibras en regeneración están coloreadas con un anticuerpo contra GAP-43. Se observan muchas fibras en los bordes
 35 superior e inferior del nervio óptico en animales tratados con 5F9, pero no en los animales con PBS.

El tratamiento con 5F9, pero no con el vehículo control PBS, incrementó significativamente la cantidad de fibras en regeneración positivas para GAP-43. Se hallaron significativamente más fibras ($p < 0.001$) en los animales tratados con 5F9 a distancias de entre 300 μm y 1800 μm que en los animales tratados con vehículo. Los animales fueron tratados con 5F9 el día 0 y el día 21, con 2 mg/kg y 10 mg/kg, respectivamente. El anticuerpo o el vehículo fueron administrados por vía intraperitoneal o vía intravenosa. Los datos provienen del análisis de 9 animales por grupo. Por cada animal, se analizaron 3 series de secciones con un crióstato. (Figura 14A)

En un segundo experimento, se trataron ratas macho Wistar después de la lesión sistémica del nervio óptico (iv) con el anticuerpo 5F9 ($n = 10$ animales), el anticuerpo control 8D1 ($n = 10$ animales) o el vehículo control con PBS ($n = 10$ animales). Las ratas fueron inyectadas una vez por semana con 2 mg/kg del anticuerpo por vía intravenosa, y las inyecciones comenzaron inmediatamente después de la compresión del nervio óptico. Todas las ratas recibieron 4 inyecciones, y los animales se sacrificaron 5 semanas después de la lesión por compresión. Los experimentadores desconocieron los grupos de tratamiento en todo momento, y el procesamiento del tejido y el análisis cuantitativo se llevaron a cabo como se describió con anterioridad. El tratamiento con 5F9, y con vehículo control PBS, incrementó significativamente la cantidad de fibras en regeneración positivas para GAP-43. Se hallaron significativamente más fibras ($p < 0,001$) en los animales tratados con 5F9 a distancias de entre 200 μm y 1400 μm que en los animales tratados con el vehículo o con el anticuerpo control. Los animales se trataron por vía intravenosa una vez a la semana durante 4 semanas, comenzando el día 0 con 5F9 (2 mg/kg por dosis), el anticuerpo control 8D1 (2 mg/kg por dosis) o PBS (Figura 14B).

Ejemplo 11: 5F9 induce la remielinización de los axones del nervio óptico dañado por compresión en un modelo de lesión del nervio óptico en rata

La proteína básica de la mielina (MBP) es un marcador para los oligodendrocitos y la mielina. Se utilizó un anticuerpo dirigido contra MBP para determinar si había diferencias en la remielinización en los distintos grupos de tratamiento. Para visualizar el proceso de remielinización, se fijaron las secciones de nervio óptico de los animales tratados de manera sistémica con acetona fría (-20°C , 10 minutos), se las lavó 3 veces (5 minutos) con solución salina amortiguada con Tris (TBS, Fluka 93312), y se los bloqueó y se los permeabilizó con TBS que contenía albúmina de suero bovina al 5% y Triton-X-100 al 1% (30 minutos) a temperatura ambiente. Se removió la BSA y el detergente residual mediante 2 pasos de lavado separados con TBS (5 minutos cada uno). Se incubaron las secciones durante 3 horas o durante la noche a 4°C con un anticuerpo policlonal de conejo anti-MBP (Abcam, ab 2404), sometido a una dilución 1:50 en una solución BSA/TBS al 5%. Después de 3 pasos de lavado con TBS y Tween al 0,1%, las secciones

fueron incubadas durante 1 hora a temperatura ambiente con un anticuerpo secundario anti-conejo conjugado a Alexa Fluor 488 (Molecular Probes A11034), diluido 1: 1000 en BSA al 5%/TBS, que contenía una dilución 1:100 de bisbenzimidá (H33258, 50 µg/ml), para visualizar los núcleos celulares. Antes de la inmersión, las secciones coloreadas se lavaron 3 veces con TBS-Tween al 0,1% (5 minutos cada paso), y con agua destilada. Las secciones se embebieron en Fluoromount G, se cubrieron con un cubreobjetos y se almacenaron en la oscuridad para su documentación al microscopio.

Utilizando un microscopio de fluorescencia Zeiss se obtuvieron imágenes de las secciones longitudinales coloreadas, las cuales fueron guardadas usando el programa Zeiss Axiovision. Se montó una imagen de cada nervio para su análisis por medio del programa de análisis de imágenes Photoshop (Adobe). Se realizó un análisis cuantitativo de dos formas diferentes usando imágenes compuestas de los nervios ópticos. Se midió el área positiva para MBP en el sitio de la lesión usando el programa informático Axiovision. El análisis de los datos y la evaluación estadística de los datos se realizaron con la ayuda del programa Graphpad Prism. Los animales se trataron con 5F9 el día 0 y el día 21, con 2 mg/kg y 10 mg/kg, respectivamente. El anticuerpo o el vehículo fueron administrados por vía intraperitoneal o vía intravenosa.

Imágenes compuestas de nervios ópticos de rata

La mielinización se visualiza usando un anticuerpo dirigido contra el marcador de mielina, la proteína básica de la mielina MBP. Los sitios de compresión están localizados en el medio de los nervios mixtos, y el área está libre en los animales control tratados con vehículo (A y B). En los animales tratados con 5F9 (C y D), se observan muchas estructuras positivas para MBP en el área media (centro de compresión) de los nervios ópticos. (Figura 15)

La mielinización se visualiza usando un anticuerpo dirigido contra el marcador de mielina, la proteína básica de la mielina MBP. Se midió el área de MBP usando el programa Zeiss Axiovision. M1 y M2 son dos mediciones independientes, y M es el área positiva para MPB medida promedio. La administración de 5F9 resulta en el aumento significativo, con un factor de 3,5 ($p < 0,001$ versus el vehículo control), del área MBP del sitio de compresión del nervio óptico (Figura 16).

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Abbott GmbH & Co. KG

5 <120> ANTICUERPOS MONOCLONALES CONTRA LA PROTEÍNA RGM A Y SUS USOS

<130> M/49229-PCT

10 <160> 68

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

15 <211> 1353

<212> ADN

<213> Homo sapiens

20 <220>

<221> CDS

<222> (1)..(1353)

<400> 1

25 atg cag ccg cca agg gag agg cta gtg gta aca ggc cga gct gga tgg 48
Met Gln Pro Pro Arg Glu Arg Leu Val Val Thr Gly Arg Ala Gly Trp
1 5 10 15

atg ggt atg ggg aga ggg gca gga cgt tca gcc ctg gga ttc tgg ccg 96

30 Met Gly Met Gly Arg Gly Ala Gly Arg Ser Ala Leu Gly Phe Trp Pro
20 25 30

acc ctc gcc ttc ctt ctc tgc agc ttc ccc gca gcc acc tcc ccg tgc 144

Thr Leu Ala Phe Leu Leu Cys Ser Phe Pro Ala Ala Thr Ser Pro Cys

35 35 40 45

aag atc ctc aag tgc aac tct gag ttc tgg agc gcc acg tcg ggc agc 192

Lys Ile Leu Lys Cys Asn Ser Glu Phe Trp Ser Ala Thr Ser Gly Ser
50 55 60

cac gcc cca gcc tca gac gac acc ccc gag ttc tgt gca gcc ttg cgc 240
5 His Ala Pro Ala Ser Asp Asp Thr Pro Glu Phe Cys Ala Ala Leu Arg
65 70 75 80

agc tac gcc ctg tgc acg cgg cgg acg gcc cgc acc tgc cgg ggt gac 288
Ser Tyr Ala Leu Cys Thr Arg Arg Thr Ala Arg Thr Cys Arg Gly Asp
10 85 90 95

ctg gcc tac cac tcg gcc gtc cat ggc ata gag gac ctc atg agc cag 336
Leu Ala Tyr His Ser Ala Val His Gly Ile Glu Asp Leu Met Ser Gln
100 105 110

15 cac aac tgc tcc aag gat ggc ccc acc tcg cag cca cgc ctg cgc acg 384
His Asn Cys Ser Lys Asp Gly Pro Thr Ser Gln Pro Arg Leu Arg Thr
115 120 125

20 ctc cca ccg gcc gga gac agc cag gag cgc tcg gac agc ccc gag atc 432
Leu Pro Pro Ala Gly Asp Ser Gln Glu Arg Ser Asp Ser Pro Glu Ile
130 135 140

tgc cat tac gag aag agc ttt cac aag cac tcg gcc acc ccc aac tac 480
25 Cys His Tyr Glu Lys Ser Phe His Lys His Ser Ala Thr Pro Asn Tyr
145 150 155 160

acg cac tgt ggc ctc ttc ggg gac cca cac ctc agg act ttc acc gac 528
Thr His Cys Gly Leu Phe Gly Asp Pro His Leu Arg Thr Phe Thr Asp
30 165 170 175

cgc ttc cag acc tgc aag gtg cag ggc gcc tgg ccg ctc atc gac aat 576
Arg Phe Gln Thr Cys Lys Val Gln Gly Ala Trp Pro Leu Ile Asp Asn
180 185 190

35 aat tac ctg aac gtg cag gcc acc aac acg cct gtg ctg ccc ggc tca 624
Asn Tyr Leu Asn Val Gln Ala Thr Asn Thr Pro Val Leu Pro Gly Ser

130
136

	195	200	205	
	gcg gcc act gcc acc agc aag ctc acc atc atc ttc aag aac ttc cag			672
	Ala Ala Thr Ala Thr Ser Lys Leu Thr Ile Ile Phe Lys Asn Phe Gln			
5	210	215	220	
	gag tgt gtg gac cag aag gtg tac cag gct gag atg gac gag ctc ccg			720
	Glu Cys Val Asp Gln Lys Val Tyr Gln Ala Glu Met Asp Glu Leu Pro			
	225	230	235	240
10				
	gcc gcc ttc gtg gat ggc tct aag aac ggt ggg gac aag cac ggg gcc			768
	Ala Ala Phe Val Asp Gly Ser Lys Asn Gly Gly Asp Lys His Gly Ala			
	245	250	255	
15				
	aac agc ctg aag atc act gag aag gtg tca ggc cag cac gtg gag atc			816
	Asn Ser Leu Lys Ile Thr Glu Lys Val Ser Gly Gln His Val Glu Ile			
	260	265	270	
	cag gcc aag tac atc ggc acc acc atc gtg gtg cgc cag gtg ggc cgc			864
20				
	Gln Ala Lys Tyr Ile Gly Thr Thr Ile Val Val Arg Gln Val Gly Arg			
	275	280	285	
	tac ctg acc ttg gcc gtc cgc atg cca gag gaa gtg gtc aat gct gtg			912
	Tyr Leu Thr Phe Ala Val Arg Met Pro Glu Glu Val Val Asn Ala Val			
25	290	295	300	
	gag gac tgg gac agc cag ggt ctc tac ctc tgc ctg cgg ggc tgc ccc			960
	Glu Asp Trp Asp Ser Gln Gly Leu Tyr Leu Cys Leu Arg Gly Cys Pro			
	305	310	315	320
30				
	ctc aac cag cag atc gac ttc cag gcc ttc cac acc aat gct gag ggc			1008
	Leu Asn Gln Gln Ile Asp Phe Gln Ala Phe His Thr Asn Ala Glu Gly			
	325	330	335	
35				
	acc ggt gcc cgc agg ctg gca gcc gcc agc cct gca ccc aca gcc ccc			1056
	Thr Gly Ala Arg Arg Leu Ala Ala Ala Ser Pro Ala Pro Thr Ala Pro			
	340	345	350	

gag acc ttc cca tac gag aca gcc gtg gcc aag tgc aag gag aag ctg 1104
Glu Thr Phe Pro Tyr Glu Thr Ala Val Ala Lys Cys Lys Glu Lys Leu
355 360 365

5
ccg gtg gag gac ctg tac tac cag gcc tgc gtc ttc gac ctc ctc acc 1152
Pro Val Glu Asp Leu Tyr Tyr Gln Ala Cys Val Phe Asp Leu Leu Thr
370 375 380

10
acg ggc gac gtg aac ttc aca ctg gcc gcc tac tac gcg ttg gag gat 1200
Thr Gly Asp Val Asn Phe Thr Leu Ala Ala Tyr Tyr Ala Leu Glu Asp
385 390 395 400

15
gtc aag atg ctc cac tcc aac aaa gac aaa ctg cac ctg tat gag agg 1248
Val Lys Met Leu His Ser Asn Lys Asp Lys Leu His Leu Tyr Glu Arg
405 410 415

20
act cgg gac ctg cca ggc agg gcg gct gcg ggg ctg ccc ctg gcc ccc 1296
Thr Arg Asp Leu Pro Gly Arg Ala Ala Ala Gly Leu Pro Leu Ala Pro
420 425 430

25
cgg ccc ctc ctg ggc gcc ctc gtc ccg ctc ctg gcc ctg ctc cct gtg 1344
Arg Pro Leu Leu Gly Ala Leu Val Pro Leu Leu Ala Leu Leu Pro Val
435 440 445

30
ttc tgc tag 1353
Phe Cys
450

35
<210> 2
<211> 450
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 2

	Met	Gln	Pro	Pro	Arg	Glu	Arg	Leu	Val	Val	Thr	Gly	Arg	Ala	Gly	Trp
	1		5			10					15					
5	Met	Gly	Met	Gly	Arg	Gly	Ala	Gly	Arg	Ser	Ala	Leu	Gly	Phe	Trp	Pro
			20			25					30					
	Thr	Leu	Ala	Phe	Leu	Leu	Cys	Ser	Phe	Pro	Ala	Ala	Thr	Ser	Pro	Cys
10		35				40							45			
	Lys	Ile	Leu	Lys	Cys	Asn	Ser	Glu	Phe	Trp	Ser	Ala	Thr	Ser	Gly	Ser
		50				55							60			
15																
	His	Ala	Pro	Ala	Ser	Asp	Asp	Thr	Pro	Glu	Phe	Cys	Ala	Ala	Leu	Arg
	65				70					75					80	
20																
	Ser	Tyr	Ala	Leu	Cys	Thr	Arg	Arg	Thr	Ala	Arg	Thr	Cys	Arg	Gly	Asp
					85								90			95
25	Leu	Ala	Tyr	His	Ser	Ala	Val	His	Gly	Ile	Glu	Asp	Leu	Met	Ser	Gln
						100					105					110
	His	Asn	Cys	Ser	Lys	Asp	Gly	Pro	Thr	Ser	Gln	Pro	Arg	Leu	Arg	Thr
30					115									120		125
	Leu	Pro	Pro	Ala	Gly	Asp	Ser	Gln	Glu	Arg	Ser	Asp	Ser	Pro	Glu	Ile
					130									135		140
35																
	Cys	His	Tyr	Glu	Lys	Ser	Phe	His	Lys	His	Ser	Ala	Thr	Pro	Asn	Tyr

133
139

	145	150	155	160
	Thr His Cys Gly Leu Phe Gly Asp Pro His Leu Arg Thr Phe Thr Asp			
5	165	170	175	
	Arg Phe Gln Thr Cys Lys Val Gln Gly Ala Trp Pro Leu Ile Asp Asn			
10	180	185	190	
	Asn Tyr Leu Asn Val Gln Ala Thr Asn Thr Pro Val Leu Pro Gly Ser			
15	195	200	205	
	Ala Ala Thr Ala Thr Ser Lys Leu Thr Ile Ile Phe Lys Asn Phe Gln			
	210	215	220	
20	Glu Cys Val Asp Gln Lys Val Tyr Gln Ala Glu Met Asp Glu Leu Pro			
	225	230	235	240
	Ala Ala Phe Val Asp Gly Ser Lys Asn Gly Gly Asp Lys His Gly Ala			
25	245	250	255	
	Asn Ser Leu Lys Ile Thr Glu Lys Val Ser Gly Gln His Val Glu Ile			
30	260	265	270	
	Gln Ala Lys Tyr Ile Gly Thr Thr Ile Val Val Arg Gln Val Gly Arg			
	275	280	285	
35	Tyr Leu Thr Phe Ala Val Arg Met Pro Glu Glu Val Val Asn Ala Val			
	290	295	300	

134
440

5 Glu Asp Trp Asp Ser Gln Gly Leu Tyr Leu Cys Leu Arg Gly Cys Pro
 305 310 315 320

10 Leu Asn Gln Gln Ile Asp Phe Gln Ala Phe His Thr Asn Ala Glu Gly
 325 330 335

15 Thr Gly Ala Arg Arg Leu Ala Ala Ala Ser Pro Ala Pro Thr Ala Pro
 340 345 350

20 Glu Thr Phe Pro Tyr Glu Thr Ala Val Ala Lys Cys Lys Glu Lys Leu
 355 360 365

25 Pro Val Glu Asp Leu Tyr Tyr Gln Ala Cys Val Phe Asp Leu Leu Thr
 370 375 380

30 Thr Gly Asp Val Asn Phe Thr Leu Ala Ala Tyr Tyr Ala Leu Glu Asp
 385 390 395 400

35 Val Lys Met Leu His Ser Asn Lys Asp Lys Leu His Leu Tyr Glu Arg
 405 410 415

40 Thr Arg Asp Leu Pro Gly Arg Ala Ala Ala Gly Leu Pro Leu Ala Pro
 420 425 430

45 Arg Pro Leu Leu Gly Ala Leu Val Pro Leu Leu Ala Leu Leu Pro Val
 435 440 445

135
~~141~~

Phe Cys
450

5
<210> 3
<211> 1929
<212> ADN
<213> Artificial

10
<220>
<223> hRGMA fc

15 <220>
<221> CDS
<222> (1)..(1929)

<220>
20 <221> péptido_señal
<222> (1)..(102)

<220>
<221> característica_misc
25 <222> (103)..(1230)
<223> Fragmento de hRGMA 47-422

<220>
<221> característica_misc
30 <222> (1231)..(1929)
<223> porción fc

<400> 3
atg gag aca gac aca ctc ctg cta tgg gta ctg ctg ctc tgg gtt cca 48
35 Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro

1 5 10 15

136
142

ggt tcc act ggt gac gcg gcc cag ccg gcc agg cgc gcg cgt acg 96
 Gly Ser Thr Gly Asp Ala Ala Gln Pro Ala Arg Arg Ala Arg Arg Thr
 20 25 30

5 aag ctt ccg tgc aag atc ctc aag tgc aac tct gag ttc tgg agc gcc 144
 Lys Leu Pro Cys Lys Ile Leu Lys Cys Asn Ser Glu Phe Trp Ser Ala
 35 40 45

acg tcg ggc agc cac gcc cca gcc tca gac gac acc ccc gag ttc tgt 192
 10 Thr Ser Gly Ser His Ala Pro Ala Ser Asp Asp Thr Pro Glu Phe Cys
 50 55 60

gca gcc ttg cgc agc tac gcc ctg tgc acg cgg cgg acg gcc cgc acc 240
 Ala Ala Leu Arg Ser Tyr Ala Leu Cys Thr Arg Arg Thr Ala Arg Thr
 15 65 70 75 80

tgc cgg ggt gac ctg gcc tac cac tcg gcc gtc cat ggc ata gag gac 288
 Cys Arg Gly Asp Leu Ala Tyr His Ser Ala Val His Gly Ile Glu Asp
 85 90 95

20 ctc atg agc cag cac aac tgc tcc aag gat ggc ccc acc tcg cag cca 336
 Leu Met Ser Gln His Asn Cys Ser Lys Asp Gly Pro Thr Ser Gln Pro
 100 105 110

25 cgc ctg cgc acg ctc cca ccg gcc gga gac agc cag gag cgc tcg gac 384
 Arg Leu Arg Thr Leu Pro Pro Ala Gly Asp Ser Gln Glu Arg Ser Asp
 115 120 125

agc ccc gag atc tgc cat tac gag aag agc ttt cac aag cac tcg gcc 432
 30 Ser Pro Glu Ile Cys His Tyr Glu Lys Ser Phe His Lys His Ser Ala
 130 135 140

acc ccc aac tac acg cac tgt ggc ctc ttc ggg gac cca cac ctc agg 480
 Thr Pro Asn Tyr Thr His Cys Gly Leu Phe Gly Asp Pro His Leu Arg
 35 145 150 155 160

act ttc acc gac cgc ttc cag acc tgc aag gtg cag ggc gcc tgg ccg 528

Thr Phe Thr Asp Arg Phe Gln Thr Cys Lys Val Gln Gly Ala Trp Pro
165 170 175

ctc atc gac aat aat tac ctg aac gtg cag gtc acc aac acg cct gtg 576
5 Leu Ile Asp Asn Asn Tyr Leu Asn Val Gln Val Thr Asn Thr Pro Val
180 185 190

ctg ccc ggc tca gcg gcc act gcc acc agc aag ctc acc atc atc ttc 624
10 Leu Pro Gly Ser Ala Ala Thr Ala Thr Ser Lys Leu Thr Ile Ile Phe
195 200 205

aag aac ttc cag gag tgt gtg gac cag aag gtg tac cag gct gag atg 672
15 Lys Asn Phe Gln Glu Cys Val Asp Gln Lys Val Tyr Gln Ala Glu Met
210 215 220

gac gag ctc ccg gcc gcc ttc gtg gat ggc tct aag aac ggt ggg gac 720
Asp Glu Leu Pro Ala Ala Phe Val Asp Gly Ser Lys Asn Gly Gly Asp
225 230 235 240

aag cac ggg gcc aac agc ctg aag atc act gag aag gtg tca ggc cag 768
20 Lys His Gly Ala Asn Ser Leu Lys Ile Thr Glu Lys Val Ser Gly Gln
245 250 255

cac gtg gag atc cag gcc aag tac atc ggc acc acc atc gtg gtg cgc 816
25 His Val Glu Ile Gln Ala Lys Tyr Ile Gly Thr Thr Ile Val Val Arg
260 265 270

cag gtg ggc cgc tac ctg acc ttt gcc gtc cgc atg cca gag gaa gtg 864
30 Gln Val Gly Arg Tyr Leu Thr Phe Ala Val Arg Met Pro Glu Glu Val
275 280 285

gtc aat gct gtg gag gac tgg gac agc cag ggt ctc tac ctc tgc ctg 912
Val Asn Ala Val Glu Asp Trp Asp Ser Gln Gly Leu Tyr Leu Cys Leu
290 295 300

cgg ggc tgc ccc ctc aac cag cag atc gac ttc cag gcc ttc cac acc 960
35 Arg Gly Cys Pro Leu Asn Gln Gln Ile Asp Phe Gln Ala Phe His Thr

138
48
144

	305	310	315	320	
	aat gct gag ggc acc ggt gcc cgc agg ctg gca gcc gcc agc cct gca				1008
	Asn Ala Glu Gly Thr Gly Ala Arg Arg Leu Ala Ala Ala Ser Pro Ala				
5	325	330	335		
	ccc aca gcc ccc gag acc ttc cca tac gag aca gcc gtg gcc aag tgc				1056
	Pro Thr Ala Pro Glu Thr Phe Pro Tyr Glu Thr Ala Val Ala Lys Cys				
	340	345	350		
10					
	aag gag aag ctg ccg gtg gag gac ctg tac tac cag gcc tgc gtc ttc				1104
	Lys Glu Lys Leu Pro Val Glu Asp Leu Tyr Tyr Gln Ala Cys Val Phe				
	355	360	365		
15					
	gac ctc ctc acc acg ggc gac gtg aac ttc aca ctg gcc gcc tac tac				1152
	Asp Leu Leu Thr Thr Gly Asp Val Asn Phe Thr Leu Ala Ala Tyr Tyr				
	370	375	380		
	gcg ttg gag gat gtc aag atg ctc cac tcc aac aaa gac aaa ctg cac				1200
20	Ala Leu Glu Asp Val Lys Met Leu His Ser Asn Lys Asp Lys Leu His				
	385	390	395	400	
	ctg tat gag agg act cgg gac ctg cca ggc ttg aat tct gca gat atc				1248
	Leu Tyr Glu Arg Thr Arg Asp Leu Pro Gly Leu Asn Ser Ala Asp Ile				
25	405	410	415		
	gag gga cga atg gat cca ccg tgc cca gca cct gaa ctc ctg ggg gga				1296
	Glu Gly Arg Met Asp Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly				
	420	425	430		
30					
	ccg tca gtc ttc ctc ttc ccc cca aaa ccc aag gac acc ctc atg atc				1344
	Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile				
	435	440	445		
35					
	tcc cgg acc cct gag gtc aca tgc gtg gtg gtg gac gtg agc cac gaa				1392
	Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu				
	450	455	460		

139
145

gac cct gag gtc aag ttc aac tgg tac gtg gac ggc gtg gag gtg cat 1440
 Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
 465 470 475 480
 5
 aat gcc aag aca aag ccg cgg gag gag cag tac aac agc acg tac cgt 1488
 Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
 485 490 495
 10
 gtg gtc agc gtc ctc acc gtc ctg cac cag gac tgg ctg aat ggc aag 1536
 Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
 500 505 510
 gag tac aag tgc aag gtc tcc aac aaa gcc ctc cca gcc ccc atc gag 1584
 15
 Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
 515 520 525
 aaa acc atc tcc aaa gcc aaa ggg cag ccc cga gaa cca cag gtg tac 1632
 Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
 20 530 535 540
 acc ctg ccc cca tcc cgg gag gag atg acc aag aac cag gtc agc ctg 1680
 Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
 545 550 555 560
 25
 acc tgc ctg gtc aaa ggc ttc tat ccc agc gac atc gcc gtg gag tgg 1728
 Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
 565 570 575
 gag agc aat ggg cag ccg gag aac aac tac aag acc acg cct ccc gtg 1776
 30
 Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
 580 585 590
 ctg gac tcc gac ggc tcc ttc ttc ctc tat agc aag ctc acc gtg gac 1824
 35
 Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
 595 600 605

140

146

aag agc agg tgg cag cag ggg aac gtc ttc tca tgc tcc gtg atg cat 1872
Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
610 615 620

5 gag gct ctg cac aac cac tac acg cag aag agc ctc tcc ctg tct ccg 1920
Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
625 630 635 640

ggt aaa tga 1929
10 Gly Lys

<210> 4
15 <211> 642
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
20 <223> Construcción sintética

<400> 4

Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro
25 1 5 10 15

Gly Ser Thr Gly Asp Ala Ala Gln Pro Ala Arg Arg Ala Arg Arg Thr
20 25 30
30

Lys Leu Pro Cys Lys Ile Leu Lys Cys Asn Ser Glu Phe Trp Ser Ala
35 40 45

35
Thr Ser Gly Ser His Ala Pro Ala Ser Asp Asp Thr Pro Glu Phe Cys
50 55 60

191
147

Ala Ala Leu Arg Ser Tyr Ala Leu Cys Thr Arg Arg Thr Ala Arg Thr
65 70 75 80

5

Cys Arg Gly Asp Leu Ala Tyr His Ser Ala Val His Gly Ile Glu Asp
 85 90 95

10

Leu Met Ser Gln His Asn Cys Ser Lys Asp Gly Pro Thr Ser Gln Pro
 100 105 110

15

Arg Leu Arg Thr Leu Pro Pro Ala Gly Asp Ser Gln Glu Arg Ser Asp
 115 120 125

Ser Pro Glu Ile Cys His Tyr Glu Lys Ser Phe His Lys His Ser Ala
20 130 135 140

Thr Pro Asn Tyr Thr His Cys Gly Leu Phe Gly Asp Pro His Leu Arg
145 150 155 160

25

Thr Phe Thr Asp Arg Phe Gln Thr Cys Lys Val Gln Gly Ala Trp Pro
 165 170 175

30

Leu Ile Asp Asn Asn Tyr Leu Asn Val Gln Val Thr Asn Thr Pro Val
 180 185 190

35

Leu Pro Gly Ser Ala Ala Thr Ala Thr Ser Lys Leu Thr Ile Ile Phe
 195 200 205

142
~~148~~

	Lys	Asn	Phe	Gln	Glu	Cys	Val	Asp	Gln	Lys	Val	Tyr	Gln	Ala	Glu	Met
	210					215										220
5																
	Asp	Glu	Leu	Pro	Ala	Ala	Phe	Val	Asp	Gly	Ser	Lys	Asn	Gly	Gly	Asp
	225					230										240
10																
	Lys	His	Gly	Ala	Asn	Ser	Leu	Lys	Ile	Thr	Glu	Lys	Val	Ser	Gly	Gln
						245										255
15																
	His	Val	Glu	Ile	Gln	Ala	Lys	Tyr	Ile	Gly	Thr	Thr	Ile	Val	Val	Arg
	260															270
20																
	Gln	Val	Gly	Arg	Tyr	Leu	Thr	Phe	Ala	Val	Arg	Met	Pro	Glu	Glu	Val
	275															285
25																
	Val	Asn	Ala	Val	Glu	Asp	Trp	Asp	Ser	Gln	Gly	Leu	Tyr	Leu	Cys	Leu
	290															300
30																
	Arg	Gly	Cys	Pro	Leu	Asn	Gln	Gln	Ile	Asp	Phe	Gln	Ala	Phe	His	Thr
	305															320
35																
	Asn	Ala	Glu	Gly	Thr	Gly	Ala	Arg	Arg	Leu	Ala	Ala	Ala	Ser	Pro	Ala
						325										335
40																
	Pro	Thr	Ala	Pro	Glu	Thr	Phe	Pro	Tyr	Glu	Thr	Ala	Val	Ala	Lys	Cys
	340															350

143
149

	Lys	Glu	Lys	Leu	Pro	Val	Glu	Asp	Leu	Tyr	Tyr	Gln	Ala	Cys	Val	Phe	
	355				360				365								
5	Asp	Leu	Leu	Thr	Thr	Gly	Asp	Val	Asn	Phe	Thr	Leu	Ala	Ala	Tyr	Tyr	
	370				375				380								
	Ala	Leu	Glu	Asp	Val	Lys	Met	Leu	His	Ser	Asn	Lys	Asp	Lys	Leu	His	
10	385				390				395				400				
	Leu	Tyr	Glu	Arg	Thr	Arg	Asp	Leu	Pro	Gly	Leu	Asn	Ser	Ala	Asp	Ile	
		405				410				415							
15																	
	Glu	Gly	Arg	Met	Asp	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	
		420				425				430							
20																	
	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	
		435				440				445							
25	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	
		450				455				460							
	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	
30	465				470				475				480				
	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	
		485				490				495							
35																	
	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	

146
150

	500	505	510
	Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu		
5	515	520	525
	Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr		
10	530	535	540
	Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu		
15	545	550	555 560
	Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp		
20	565	570	575
	Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val		
	580	585	590
	Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp		
25	595	600	605
	Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His		
30	610	615	620
	Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro		
35	625	630	635 640
	Gly Lys		

145
157

<210> 5
<211> 1167
5 <212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> hRGMA LC fc
10

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(1167)
15

<220>
<221> péptido_señal
<222> (1)..(102)

20 <220>
<221> característica_misc
<222> (103)..(468)
<223> Fragmento de hRGMA 47-168

25 <220>
<221> característica_misc
<222> (469)..(1167)
<223> porción fc

30 <400> 5
atg gag aca gac aca ctc ctg cta tgg gta ctg ctg ctc tgg gtt cca 48
Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro
1 5 10 15

35 ggt tcc act ggt gac gcg gcc cag ccg gcc agg cgc gcg cgc cgt acg 96
Gly Ser Thr Gly Asp Ala Ala Gln Pro Ala Arg Arg Ala Arg Arg Thr
20 25 30

146
152

aag ctt ccg tgc aag atc ctc aag tgc aac tct gag ttc tgg agc gcc 144
 Lys Leu Pro Cys Lys Ile Leu Lys Cys Asn Ser Glu Phe Trp Ser Ala
 35 40 45

5
 acg tcg ggc agc cac gcc cca gcc tca gac gac acc ccc gag ttc tgt 192
 Thr Ser Gly Ser His Ala Pro Ala Ser Asp Asp Thr Pro Glu Phe Cys
 50 55 60

10
 gca gcc ttg cgc agc tac gcc ctg tgc acg cgg cgg acg gcc cgc acc 240
 Ala Ala Leu Arg Ser Tyr Ala Leu Cys Thr Arg Arg Thr Ala Arg Thr
 65 70 75 80

15
 tgc cgg ggt gac ctg gcc tac cac tcg gcc gtc cat ggc ata gag gac 288
 Cys Arg Gly Asp Leu Ala Tyr His Ser Ala Val His Gly Ile Glu Asp
 85 90 95

20
 ctc atg agc cag cac aac tgc tcc aag gat ggc ccc acc tcg cag cca 336
 Leu Met Ser Gln His Asn Cys Ser Lys Asp Gly Pro Thr Ser Gln Pro
 100 105 110

25
 cgc ctg cgc acg ctc cca ccg gcc gga gac agc cag gag cgc tcg gac 384
 Arg Leu Arg Thr Leu Pro Pro Ala Gly Asp Ser Gln Glu Arg Ser Asp
 115 120 125

30
 acc ccc aac tac acg cac tgt ggc ctc ttc ggg gac ttg aat tct gca 480
 Thr Pro Asn Tyr Thr His Cys Gly Leu Phe Gly Asp Leu Asn Ser Ala
 145 150 155 160

35
 gat atc gag gga cga atg gat cca ccg tgc cca gca cct gaa ctc ctg 528
 Asp Ile Glu Gly Arg Met Asp Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
 165 170 175

ggg gga ccg tca gtc ttc ctc ttc ccc cca aaa ccc aag gac acc ctc 576
Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
180 185 190

5 atg atc tcc cgg acc cct gag gtc aca tgc gtg gtg gac gtg agc 624
Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
195 200 205

cac gaa gac cct gag gtc aag ttc aac tgg tac gtg gac ggc gtg gag 672
10 His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
210 215 220

gtg cat aat gcc aag aca aag ccg cgg gag gag cag tac aac agc acg 720
Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
15 225 230 235 240

tac cgt gtg gtc agc gtc ctc acc gtc ctg cac cag gac tgg ctg aat 768
Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
245 250 255

20 ggc aag gag tac aag tgc aag gtc tcc aac aaa gcc ctc cca gcc ccc 816
Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
260 265 270

25 atc gag aaa acc atc tcc aaa gcc aaa ggg cag ccc cga gaa cca cag 864
Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
275 280 285

gtg tac acc ctg ccc cca tcc cgg gag gag atg acc aag aac cag gtc 912
30 Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val
290 295 300

agc ctg acc tgc ctg gtc aaa ggc ttc tat ccc agc gac atc gcc gtg 960
Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
35 305 310 315 320

gag tgg gag agc aat ggg cag ccg gag aac aac tac aag acc acg cct 1008

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
325 330 335

ccc gtg ctg gac tcc gac ggc tcc ttc ttc ctc tat agc aag ctc acc 1056
5 Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
340 345 350

gtg gac aag agc agg tgg cag cag ggg aac gtc ttc tca tgc tcc gtg 1104
Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
10 355 360 365

atg cat gag gct ctg cac aac cac tac acg cag aag agc ctc tcc ctg 1152
Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
370 375 380

15 tct ccg ggt aaa tga 1167
Ser Pro Gly Lys
385

20 <210> 6
<211> 388
<212> PRT
<213> Artificial
25 <220>
<223> Construcción sintética

<400> 6
30 Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro
1 5 10 15

35 Gly Ser Thr Gly Asp Ala Ala Gln Pro Ala Arg Arg Ala Arg Arg Thr
20 25 30

149
150

	Lys	Leu	Pro	Cys	Lys	Ile	Leu	Lys	Cys	Asn	Ser	Glu	Phe	Trp	Ser	Ala	
	35				40				45								
5																	
	Thr	Ser	Gly	Ser	His	Ala	Pro	Ala	Ser	Asp	Asp	Thr	Pro	Glu	Phe	Cys	
	50				55				60								
10																	
	Ala	Ala	Leu	Arg	Ser	Tyr	Ala	Leu	Cys	Thr	Arg	Arg	Thr	Ala	Arg	Thr	
	65				70				75				80				
15																	
	Cys	Arg	Gly	Asp	Leu	Ala	Tyr	His	Ser	Ala	Val	His	Gly	Ile	Glu	Asp	
			85					90					95				
20																	
	Leu	Met	Ser	Gln	His	Asn	Cys	Ser	Lys	Asp	Gly	Pro	Thr	Ser	Gln	Pro	
			100				105				110						
25																	
	Arg	Leu	Arg	Thr	Leu	Pro	Pro	Ala	Gly	Asp	Ser	Gln	Glu	Arg	Ser	Asp	
		115				120				125							
30																	
	Ser	Pro	Glu	Ile	Cys	His	Tyr	Glu	Lys	Ser	Phe	His	Lys	His	Ser	Ala	
		130				135					140						
35																	
	Thr	Pro	Asn	Tyr	Thr	His	Cys	Gly	Leu	Phe	Gly	Asp	Leu	Asn	Ser	Ala	
	145				150				155				160				
40																	
	Asp	Ile	Glu	Gly	Arg	Met	Asp	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	
			165				170					175					

180
~~186~~

	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu
			180				185				190					
5	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser
			195				200				205					
	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu
10		210				215				220						
	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr
	225				230				235			240				
15																
	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn
			245				250				255					
20																
	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro
		260				265				270						
25	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln
		275				280				285						
	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val
30		290				295				300						
	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val
	305				310				315			320				
35																
	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro

157
157

	325	330	335	
	Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr			
5	340	345	350	
	Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val			
10	355	360	365	
	Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu			
15	370	375	380	
	Ser Pro Gly Lys			
	385			
20	<210> 7			
	<211> 1431			
	<212> ADN			
	<213> Rattus sp.			
25	<220>			
	<221> CDS			
	<222> (1)..(1431)			
30	<400> 7			
	atg gag aca gac aca ctc ctg cta tgg gta ctg ctg ctc tgg gtt cca 48			
	Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro			
	1	5	10	15
35	ggt tcc act ggt gac gcg gcc cag ccg gcc agg cgc gcg cgc cgt acg 96			
	Gly Ser Thr Gly Asp Ala Ala Gln Pro Ala Arg Arg Ala Arg Arg Thr			
	20	25	30	

152
158

aag ctt ggt acc gag ctc gga tcc act agt cca gtg tgg tgg aat tct 144
 Lys Leu Gly Thr Glu Leu Gly Ser Thr Ser Pro Val Trp Trp Asn Ser
 35 40 45
 5
 gca gat atc aca agt ttg tac aaa aaa gca ggc tcc ccg tgc aag atc 192
 Ala Asp Ile Thr Ser Leu Tyr Lys Lys Ala Gly Ser Pro Cys Lys Ile
 50 55 60
 10
 ctc aag tgc aac tct gag ttc tgg agc gcc acg tcg tca ggc agc cac 240
 Leu Lys Cys Asn Ser Glu Phe Trp Ser Ala Thr Ser Ser Gly Ser His
 65 70 75 80
 gcc cct gcc tct gac gac gtg ccc gag ttc tgt gct gcc ctg cgc acc 288
 15 Ala Pro Ala Ser Asp Asp Val Pro Glu Phe Cys Ala Ala Leu Arg Thr
 85 90 95
 tac gcc ctg tgc acg cga cgg aca gcc cgc acc tgc cgg ggc gac ctg 336
 Tyr Ala Leu Cys Thr Arg Arg Thr Ala Arg Thr Cys Arg Gly Asp Leu
 20 100 105 110
 gct tac cac tcg gct gtc cat ggc ata gag gac ctc atg agc cag cac 384
 Ala Tyr His Ser Ala Val His Gly Ile Glu Asp Leu Met Ser Gln His
 115 120 125
 25
 aac tgc tcc aag gat ggc ccc acc tca cag cct cga gtg cgc acg ctc 432
 Asn Cys Ser Lys Asp Gly Pro Thr Ser Gln Pro Arg Val Arg Thr Leu
 130 135 140
 ccg cca gct ggg gac agc cag gag cgc tca gat agc ccc gag atc tgc 480
 30 Pro Pro Ala Gly Asp Ser Gln Glu Arg Ser Asp Ser Pro Glu Ile Cys
 145 150 155 160
 cac tat gag aag agt ttc cac aag cac tca gct gcc ccc aac tac act 528
 35 His Tyr Glu Lys Ser Phe His Lys His Ser Ala Ala Pro Asn Tyr Thr
 165 170 175

153
151

cac tgc ggc ctc ttt ggg gac cca cac ctc agg act ttc aca gac cac 576
 His Cys Gly Leu Phe Gly Asp Pro His Leu Arg Thr Phe Thr Asp His
 180 185 190

5 ttc cag aca tgt aag gtg caa ggc gct tgg cct ctc atc gac aat aat 624
 Phe Gln Thr Cys Lys Val Gln Gly Ala Trp Pro Leu Ile Asp Asn Asn
 195 200 205

10 tac ctg aac gtg cag gtc acc aat aca cct gtg ctg ccc ggc tct gcc 672
 Tyr Leu Asn Val Gln Val Thr Asn Thr Pro Val Leu Pro Gly Ser Ala
 210 215 220

15 gcc act gcc acc agc aag ctc acc atc atc ttc aag aac ttc caa gag 720
 Ala Thr Ala Thr Ser Lys Leu Thr Ile Ile Phe Lys Asn Phe Gln Glu
 225 230 235 240

20 tgt gtg gac cag aaa gta tac caa gcc gag atg gac gag ctt ccg tcc 768
 Cys Val Asp Gln Lys Val Tyr Gln Ala Glu Met Asp Glu Leu Pro Ser
 245 250 255

gcc ttg gcc gat ggc tcc aaa aac ggt gga gat aaa cac gga gcc aac 816
 Ala Phe Ala Asp Gly Ser Lys Asn Gly Gly Asp Lys His Gly Ala Asn
 260 265 270

25 agc ctg aag atc aca gag aag gtg tca ggc cag cac gtg gag atc cag 864
 Ser Leu Lys Ile Thr Glu Lys Val Ser Gly Gln His Val Glu Ile Gln
 275 280 285

30 gcc aag tac atc ggc acc acc atc gtg gtg aga cag gtg ggc cgc tac 912
 Ala Lys Tyr Ile Gly Thr Thr Ile Val Val Arg Gln Val Gly Arg Tyr
 290 295 300

35 ctg acc ttc gcc gtc cgg atg ccc gag gag gta gtc aac gcc gtg gag 960
 Leu Thr Phe Ala Val Arg Met Pro Glu Glu Val Val Asn Ala Val Glu
 305 310 315 320

gac cgt gac agc caa ggc ctc tac ctc tgc ctg cgg ggc tgc ccg ctc 1008

154
160

Asp Arg Asp Ser Gln Gly Leu Tyr Leu Cys Leu Arg Gly Cys Pro Leu
 325 330 335

aac cag cag atc gac ttc cag gct ttc cgt gcc aac gcc gag agc cct 1056
 5 Asn Gln Gln Ile Asp Phe Gln Ala Phe Arg Ala Asn Ala Glu Ser Pro
 340 345 350

cgc agg cca gca gct gcc agc ccc tct cct gtg gtc ccc gag aca ttt 1104
 Arg Arg Pro Ala Ala Ala Ser Pro Ser Pro Val Val Pro Glu Thr Phe
 10 355 360 365

ccg tac gag aca gct gtg gcc aag tgc aaa gag aag ctg cct gta gaa 1152
 Pro Tyr Glu Thr Ala Val Ala Lys Cys Lys Glu Lys Leu Pro Val Glu
 370 375 380

15 gac ttg tac tac cag gcc tgt gtc ttc gac ctc ctc acg act ggc gac 1200
 Asp Leu Tyr Tyr Gln Ala Cys Val Phe Asp Leu Leu Thr Thr Gly Asp
 385 390 395 400

20 gtg aac ttc acg ctg gcc gcc tac tat gct ttg gag gat ggc aag atg 1248
 Val Asn Phe Thr Leu Ala Ala Tyr Tyr Ala Leu Glu Asp Gly Lys Met
 405 410 415

ctc cac tcc aac aag gac aag cta cac ctg ttt gaa agg act cgg gag 1296
 25 Leu His Ser Asn Lys Asp Lys Leu His Leu Phe Glu Arg Thr Arg Glu
 420 425 430

ctg cct gac cca gct ttc ttg tac aaa gtg gtg ata tcc agc aca gtg 1344
 Leu Pro Asp Pro Ala Phe Leu Tyr Lys Val Val Ile Ser Ser Thr Val
 30 435 440 445

gcg gcc gct cga gga ggg ccc gaa caa aaa ctc atc tca gaa gag gat 1392
 Ala Ala Ala Arg Gly Gly Pro Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp
 450 455 460

35 ctg aat agc gcc gtc gac cat cat cat cat cat tga 1431
 Leu Asn Ser Ala Val Asp His His His His His His

155
161

465 470 475

<210> 8

5 <211> 476

<212> PRT

<213> Rattus sp.

<400> 8

10

Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro

1 5 10 15

15 Gly Ser Thr Gly Asp Ala Ala Gln Pro Ala Arg Arg Ala Arg Arg Thr

20 25 30

Lys Leu Gly Thr Glu Leu Gly Ser Thr Ser Pro Val Trp Trp Asn Ser

20 35 40 45

Ala Asp Ile Thr Ser Leu Tyr Lys Lys Ala Gly Ser Pro Cys Lys Ile

50 55 60

25

Leu Lys Cys Asn Ser Glu Phe Trp Ser Ala Thr Ser Ser Gly Ser His

65 70 75 80

30

Ala Pro Ala Ser Asp Asp Val Pro Glu Phe Cys Ala Ala Leu Arg Thr

85 90 95

35 Tyr Ala Leu Cys Thr Arg Arg Thr Ala Arg Thr Cys Arg Gly Asp Leu

100 105 110

156
~~162~~

	Ala Tyr His Ser Ala Val His Gly Ile Glu Asp Leu Met Ser Gln His	
	115 120 125	
5	Asn Cys Ser Lys Asp Gly Pro Thr Ser Gln Pro Arg Val Arg Thr Leu	
	130 135 140	
10	Pro Pro Ala Gly Asp Ser Gln Glu Arg Ser Asp Ser Pro Glu Ile Cys	
	145 150 155 160	
	His Tyr Glu Lys Ser Phe His Lys His Ser Ala Ala Pro Asn Tyr Thr	
15	165 170 175	
	His Cys Gly Leu Phe Gly Asp Pro His Leu Arg Thr Phe Thr Asp His	
	180 185 190	
20	Phe Gln Thr Cys Lys Val Gln Gly Ala Trp Pro Leu Ile Asp Asn Asn	
	195 200 205	
25	Tyr Leu Asn Val Gln Val Thr Asn Thr Pro Val Leu Pro Gly Ser Ala	
	210 215 220	
30	Ala Thr Ala Thr Ser Lys Leu Thr Ile Ile Phe Lys Asn Phe Gln Glu	
	225 230 235 240	
	Cys Val Asp Gln Lys Val Tyr Gln Ala Glu Met Asp Glu Leu Pro Ser	
35	245 250 255	

157
163

	Ala	Phe	Ala	Asp	Gly	Ser	Lys	Asn	Gly	Gly	Asp	Lys	His	Gly	Ala	Asn	
	260					265			270								
5	Ser	Leu	Lys	Ile	Thr	Glu	Lys	Val	Ser	Gly	Gln	His	Val	Glu	Ile	Gln	
	275					280			285								
	Ala	Lys	Tyr	Ile	Gly	Thr	Thr	Ile	Val	Val	Arg	Gln	Val	Gly	Arg	Tyr	
10	290					295			300								
	Leu	Thr	Phe	Ala	Val	Arg	Met	Pro	Glu	Glu	Val	Val	Asn	Ala	Val	Glu	
	305					310			315				320				
15																	
	Asp	Arg	Asp	Ser	Gln	Gly	Leu	Tyr	Leu	Cys	Leu	Arg	Gly	Cys	Pro	Leu	
						325			330				335				
20																	
	Asn	Gln	Gln	Ile	Asp	Phe	Gln	Ala	Phe	Arg	Ala	Asn	Ala	Glu	Ser	Pro	
						340			345				350				
25	Arg	Arg	Pro	Ala	Ala	Ala	Ser	Pro	Ser	Pro	Val	Val	Pro	Glu	Thr	Phe	
						355			360				365				
	Pro	Tyr	Glu	Thr	Ala	Val	Ala	Lys	Cys	Lys	Glu	Lys	Leu	Pro	Val	Glu	
30						370			375				380				
	Asp	Leu	Tyr	Tyr	Gln	Ala	Cys	Val	Phe	Asp	Leu	Leu	Thr	Thr	Gly	Asp	
						385			390				395			400	
35																	
	Val	Asn	Phe	Thr	Leu	Ala	Ala	Tyr	Tyr	Ala	Leu	Glu	Asp	Gly	Lys	Met	

158
164

		405	410	415	
		Leu His Ser Asn Lys Asp Lys Leu His Leu Phe Glu Arg Thr Arg Glu			
5		420	425	430	
		Leu Pro Asp Pro Ala Phe Leu Tyr Lys Val Val Ile Ser Ser Thr Val			
		435	440	445	
10		Ala Ala Ala Arg Gly Gly Pro Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp			
		450	455	460	
15		Leu Asn Ser Ala Val Asp His His His His His His			
		465	470	475	
20	<210>	9			
	<211>	115			
	<212>	PRT			
	<213>	Artificial			
25	<220>				
	<223>	VH 5F9			
	<220>				
30	<221>	característica_misc			
	<222>	(62)..(62)			
	<223>	Xaa puede ser cualquier aminoácido de ocurrencia natural			
	<400>	9			
35		Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Ser			
		1	5	10	15

159
160

	Ser	Leu	Lys	Leu	Ser	Cys	Val	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Asn	Tyr
		20			25				30							
5																
	Gly	Met	Asn	Trp	Ile	Arg	Gln	Ala	Pro	Lys	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile
		35			40				45							
10																
	Gly	Met	Ile	Tyr	Tyr	Asp	Ser	Ser	Glu	Lys	His	Tyr	Ala	Xaa	Ser	Val
		50			55				60							
15																
	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr
		65			70				75					80		
	Leu	Glu	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Ile	Tyr	Tyr	Cys
20			85			90			95							
	Ala	Lys	Gly	Thr	Thr	Pro	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Val	Met	Val	Thr
		100			105				110							
25																
	Val	Ser	Ser													
		115														
30																
	<210>	10														
	<211>	113														
	<212>	PRT														
	<213>	Artificial														
35																
	<220>															
	<223>	VL 5F9														

180
466

<400> 10

Asp Val Val Leu Thr Gln Thr Pro Val Ser Leu Ser Val Thr Leu Gly
5 1 5 10 15

Asp Gln Ala Ser Met Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Glu Tyr Ser
 20 25 30
10

Asp Gly Tyr Thr Phe Leu Glu Trp Phe Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45
15

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Glu Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
 50 55 60

Asp Arg Phe Ile Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80
20

Ser Arg Val Glu Pro Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Ala
25 85 90 95

Thr His Asp Pro Leu Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110
30

Arg

35

<210> 11
<211> 330

161
~~167~~

<212> PRT
<213> Artificial

<220>

5 <223> región constante de Ig gamma-1

<400> 11

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Phe Leu Ala Pro Ser Ser Lys
10 1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30
15

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45
20

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80
25

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95
30

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
100 105 110
35

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro

162
~~160~~

	115	120	125	
	Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys			
5	130	135	140	
	Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp			
10	145	150	155	160
	Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu			
15		165	170	175
	Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu			
	180	185	190	
20	His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn			
	195	200	205	
	Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly			
25	210	215	220	
	Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu			
30	225	230	235	240
	Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr			
	245	250	255	
35	Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn			
	260	265	270	

163
~~169~~

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
275 280 285

5

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
290 295 300

10

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305 310 315 320

15

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
325 330

<210> 12

20 <211> 330

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

25 <223> región constante mutante de Ig gamma-1

<400> 12

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
30 1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

35

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser

164
~~170~~

	35	40	45	
	Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser			
5	50	55	60	
	Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr			
10	65	70	75	80
	Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys			
15	85	90	95	
	Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys			
	100	105	110	
20	Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro			
	115	120	125	
	Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys			
25	130	135	140	
	Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp			
30	145	150	155	160
	Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu			
	165	170	175	
35	Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu			
	180	185	190	

165
~~171~~

	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	
	195				200				205								
5																	
	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	
	210				215				220								
10																	
	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	
	225				230				235				240				
15																	
	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	
					245			250				255					
20																	
	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	
	260					265						270					
25																	
	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	
	275					280						285					
30																	
	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	
	290					295						300					
35																	
	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	
	305					310				315			320				
	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys							
						325				330							

166
~~172~~

<210> 13
<211> 106
<212> PRT
5 <213> Artificial

<220>
<223> región constante de Ig Kappa

10 <400> 13

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
1 5 10 15

15
Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
20 25 30

20 Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
35 40 45

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
25 50 55 60

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
65 70 75 80
30
His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
85 90 95
35
Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
100 105

167
173

<210> 14
<211> 105
5 <212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> región constante de Ig Lambda
10
<400> 14

Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu
1 5 10 15
15

Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe
20 25 30

20
Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val
35 40 45

25 Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys
50 55 60

Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser
30 65 70 75 80

His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu
85 90 95
35

Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser

168
174

100 105

<210> 15
5 <211> 30
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
10 <223> VH3-48/JH3 FR1

<400> 15

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
15 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser
20 25 30

<210> 16
<211> 14
<212> PRT
25 <213> Artificial

<220>
<223> VH3-48/JH3 FR2

30 <400> 16

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser
1 5 10

35
<210> 17
<211> 32

169
175

<212> PRT
<213> Artificial

<220>

5 <223> VH3-48/JH3 FR3

<400> 17

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr Leu Gln

10 1 5 10 15

Met Asn Ser Leu Arg Asp Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg

15 20 25 30

<210> 18
<211> 11
<212> PRT
20 <213> Artificial

<220>
<223> VH3-49/JH3 FR4

25 <400> 18

Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

30 <210> 19
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial

35 <220>
<223> VH3-48/JH4 FR4

<400> 19

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

5 1 5 10

<210> 20

<211> 11

10 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> VH3-48/JH6 FR4

15

<400> 20

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

1 5 10

20

<210> 21

<211> 30

<212> PRT

25 <213> Artificial

<220>

<223> VH3-33/JH6 FR!

30 <400> 21

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg

1 5 10 15

35

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser

20 25 30

171
177

<210> 22
<211> 14
5 <212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> VH3-33/JH6 FR2
10
<400> 22

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala
1 5 10

15

<210> 23
<211> 32
<212> PRT
20 <213> Artificial

<220>
<223> VH3-33/JH6 FR3

25 <400> 23

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln
1 5 10 15

30
Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
20 25 30

35 <210> 24
<211> 30
<212> PRT

172
~~178~~

<213> Artificial

<220>

<223> VH3-23/JH3 FR1

5

<400> 24

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15

10

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser

20 25 30

15

<210> 25

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial

20

<220>

<223> VH3-23/JH3 FR2

<400> 25

25

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser

1 5 10

30

<210> 26

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial

35

<220>

<223> VH3-23/JH3 FR3

173
~~179~~

<400> 26

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln
1 5 10 15

5

Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys
 20 25 30

10

<210> 27
<211> 23
<212> PRT
<213> Artificial

15

<220>
<223> A18/JK2 FR1

<400> 27

20

Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Ser Val Thr Pro Gly
1 5 10 15

25 Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys
 20

30 <210> 28
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial

35 <220>
 <223> A18/JK2 FR2

<400> 28

124
~~180~~

Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr
1 5 10 15

5

<210> 29
<211> 32
<212> PRT
<213> Artificial

10

<220>
<223> A18/JK2 FR3

<400> 29

15

Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
1 5 10 15

20 Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys
 20 25 30

<210> 30
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial

25

<220>

30 <223> A18/JK2 FR4

<400> 30

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg

35 1 5 10

175
181

<210> 31
<211> 23
<212> PRT
<213> Artificial

5

<220>
<223> A17/JK2 FR1

<400> 31

10

Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Leu Gly
1 5 10 15

15 Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys
 20

<210> 32
<211> 15
<212> PRT
<213> Artificial

20

<220>
<223> A17/JK2 FR2

25

<400> 32

Trp Phe Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser Pro Arg Arg Leu Ile Tyr
30 1 5 10 15

<210> 33
<211> 32
<212> PRT
<213> Artificial

35

176
~~182~~

<220>

<223> A17/JK2 FR3

<400> 33

5

Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
1 5 10 15

10 Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys
20 25 30

<210> 34

15 <211> 115

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

20 <223> VH 5F9

<400> 34

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Ser
25 1 5 10 15

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr
20 25 30

30

Gly Met Asn Trp Ile Arg Gln Ala Pro Lys Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

35

Gly Met Ile Tyr Tyr Asp Ser Ser Glu Lys His Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

172
~~183~~

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

5

Leu Glu Met Asn Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys
 85 90 95

10

Ala Lys Gly Thr Thr Pro Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Val Met Val Thr
 100 105 110

15 Val Ser Ser
 115

<210> 35

20 <211> 115
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>

25 <223> VH 5F9.1-GL

<400> 35

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
30 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr
 20 25 30

35

Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

178
184

	35	40	45
	Ser Met Ile Tyr Tyr Asp Ser Ser Glu Lys His Tyr Ala Asp Ser Val		
5	50	55	60
	Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr		
10	65	70	75 80
	Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Asp Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys		
15	85	90	95
	Ala Arg Gly Thr Thr Pro Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr		
20	100	105	110
	Val Ser Ser		
25	115		
	<210> 36		
	<211> 115		
	<212> PRT		
	<213> Artificial		
	<220>		
30	<223> VH 5F9.2-GL		
	<400> 36		
	Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly		
35	1	5	10 15

179
180

	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Asn	Tyr	
		20			25				30								
5	Gly	Met	Asn	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val	
		35			40				45								
	Ser	Met	Ile	Tyr	Tyr	Asp	Ser	Ser	Glu	Lys	His	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val	
10		50			55				60								
	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ala	Lys	Asn	Ser	Leu	Tyr	
	65			70				75			80						
15																	
	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Asp	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	
			85			90			95								
20																	
	Ala	Arg	Gly	Thr	Thr	Pro	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	
		100				105			110								
25	Val	Ser	Ser														
		115															
	<210>	37															
30	<211>	115															
	<212>	PRT															
	<213>	Artificial															
	<220>																
35	<223>	VH 5F9.3-GL															
	<400>	37															

	Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
	1 5 10 15
5	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr
	20 25 30
10	Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
	35 40 45
	Ser Met Ile Tyr Tyr Asp Ser Ser Glu Lys His Tyr Ala Asp Ser Val
15	50 55 60
	Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
20	65 70 75 80
	Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Asp Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
	85 90 95
25	Ala Arg Gly Thr Thr Pro Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr
	100 105 110
30	Val Ser Ser
	115
	<210> 38
35	<211> 115
	<212> PRT
	<213> Artificial

181
~~187~~

<220>

<223> VH 5F9.4-GL

5 <400> 38

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg

1 5 10 15

10

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr

20 25 30

15 Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ala Met Ile Tyr Tyr Asp Ser Ser Glu Lys His Tyr Ala Asp Ser Val

20 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr

65 70 75 80

25

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

30

Ala Arg Gly Thr Thr Pro Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr

100 105 110

35 Val Ser Ser

115

<210> 39

<211> 115

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> VH 5F9.5-GL

10 <400> 39

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg

1 5 10 15

15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr

20 25 30

20

Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ala Met Ile Tyr Tyr Asp Ser Ser Glu Lys His Tyr Ala Asp Ser Val

25 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr

65 70 75 80

30

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

35

Ala Arg Gly Thr Thr Pro Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr

100 105 110

183
~~189~~

Val Ser Ser
115
5

<210> 40
<211> 115
<212> PRT
10 <213> Artificial

<220>
<223> VH 5F9.6-GL

15 <400> 40

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

20
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr
20 25 30

25 Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Met Ile Tyr Tyr Asp Ser Ser Glu Lys His Tyr Ala Asp Ser Val
30 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80
35

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

184.
~~190~~

	85	90	95
	Ala Arg Gly Thr Thr Pro Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr		
5	100	105	110
	Val Ser Ser		
	115		
10			
	<210> 41		
	<211> 115		
	<212> PRT		
15	<213> Artificial		
	<220>		
	<223> VH 5F9.7-GL		
20	<400> 41		
	Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly		
	1	5	10 15
25	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr		
	20	25	30
30	Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val		
	35	40	45
	Ser Met Ile Tyr Tyr Asp Ser Ser Glu Lys His Tyr Ala Asp Ser Val		
35	50	55	60

185
191

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

5 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

10 Ala Lys Gly Thr Thr Pro Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr
 100 105 110

15 Val Ser Ser
 115

20 <210> 42
 <211> 115
 <212> PRT
 <213> Artificial

 <220>
 <223> VH 5F9.8-GL

25 <400> 42

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

30 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr
 20 25 30

35 Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

186
192

Ser Met Ile Tyr Tyr Asp Ser Ser Glu Lys His Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

5

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

10

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

15

Ala Lys Gly Thr Thr Pro Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
100 105 110

Val Ser Ser
115

20

<210> 43
<211> 115
<212> PRT
25 <213> Artificial

<220>
<223> VH 5F9.9-GL

30 <400> 43

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

35

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr
20 25 30

187
193

5 Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

10 Ser Met Ile Tyr Tyr Asp Ser Ser Glu Lys His Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

15 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

20 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

25 Ala Lys Gly Thr Thr Pro Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr
100 105 110

30 Val Ser Ser
115

<210> 44
<211> 113
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> VL 5F9.1-GL

<400> 44

Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Ser Val Thr Pro Gly

188
194

	1	5	10	15
	Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Glu Tyr Ser			
5	20	25	30	
	Asp Gly Tyr Thr Phe Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser			
10	35	40	45	
	Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Glu Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro			
15	50	55	60	
	Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile			
	65	70	75	80
20	Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Ala			
	85	90	95	
	Thr His Asp Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys			
25	100	105	110	
	Arg			
30				
	<210> 45			
	<211> 113			
	<212> PRT			
35	<213> Artificial			
	<220>			

189
~~190~~

<223> VL 5F9.2-GL

<400> 45

5 Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Leu Gly
 1 5 10 15

 Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Glu Tyr Ser
10 20 25 30

 Asp Gly Tyr Thr Phe Leu Glu Trp Phe Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser
 35 40 45
15

 Pro Arg Arg Leu Ile Tyr Glu Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
 50 55 60

20 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80

25 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Ala
 85 90 95

 Thr His Asp Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
30 100 105 110

 Arg

35

<210> 46

190
196

<211> 113
<212> PRT
<213> Artificial

5 <220>
<223> VL 5F9.3-GL

<400> 46

10 Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Leu Gly
1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Glu Tyr Ser
15 20 25 30

Asp Gly Tyr Thr Phe Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

20

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Glu Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60

25

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80

30 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Ala
85 90 95

Thr His Asp Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
35 100 105 110

191
~~181~~
197

Arg

5 <210> 47
 <211> 115
 <212> PRT
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> VH h5F9.1

 <400> 47

15 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15

 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr
20 20 25 30

 Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

25 Ala Met Ile Tyr Tyr Asp Ser Ser Glu Lys His Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

30 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

35 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

192
198

Ala Arg Gly Thr Thr Pro Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr
100 105 110

5
Val Ser Ser
115

10 <210> 48
<211> 115
<212> PRT
<213> Artificial

15 <220>
<223> VH h5F9.2

<400> 48

20 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr
25 20 25 30

Gly Met Asn Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

30
Gly Met Ile Tyr Tyr Asp Ser Ser Glu Lys His Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

35
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

5

Ala Lys Gly Thr Thr Pro Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr
100 105 110

10

Val Ser Ser
115

15 <210> 49
<211> 115
<212> PRT
<213> Artificial

20 <220>
<223> VH h5F9.3

<400> 49

25 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr
30 20 25 30

Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

35

Ser Met Ile Tyr Tyr Asp Ser Ser Glu Lys His Tyr Ala Asp Ser Val

194
~~200~~

	50	55	60	
	Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr			
5	65	70	75	80
	Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys			
	85	90	95	
10				
	Ala Lys Gly Thr Thr Pro Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr			
	100	105	110	
15				
	Val Ser Ser			
	115			
20	<210>	50		
	<211>	115		
	<212>	PRT		
	<213>	Artificial		
25	<220>			
	<223>	VH h5F9.4		
	<400>	50		
30	Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly			
	1	5	10	15
	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr			
35	20	25	30	

195
201

	Gly Met Asn Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
	35 40 45
5	Gly Met Ile Tyr Tyr Asp Ser Ser Glu Lys His Tyr Ala Asp Ser Val
	50 55 60
10	Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
	65 70 75 80
15	Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
	85 90 95
20	Ala Lys Gly Thr Thr Pro Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr
	100 105 110
	Val Ser Ser
	115
25	<210> 51
	<211> 113
	<212> PRT
	<213> Artificial
30	<220>
	<223> VL h5F9.19
	<400> 51
35	Asp Val Val Leu Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Leu Gly
	1 5 10 15

196
18
202

	Gln	Pro	Ala	Ser	Ile	Ser	Cys	Arg	Ser	Ser	Gln	Ser	Leu	Glu	Tyr	Ser
		20				25					30					
5																
	Asp	Gly	Tyr	Thr	Phe	Leu	Glu	Trp	Phe	Gln	Gln	Arg	Pro	Gly	Gln	Ser
		35				40						45				
10	Pro	Arg	Leu	Leu	Ile	Tyr	Glu	Val	Ser	Asn	Arg	Phe	Ser	Gly	Val	Pro
		50				55					60					
	Asp	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Lys	Ile
15	65				70					75				80		
	Ser	Arg	Val	Glu	Ala	Glu	Asp	Val	Gly	Val	Tyr	Tyr	Cys	Phe	Gln	Ala
				85				90				95				
20																
	Thr	His	Asp	Pro	Leu	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys
				100				105				110				
25																
	Arg															
30	<210>	52														
	<211>	113														
	<212>	PRT														
	<213>	Artificial														
35	<220>															
	<223>	VL h5F9.20														

197
203

<400> 52

Asp Val Val Leu Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Leu Gly

1 5 10 15

5

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Glu Tyr Ser

20 25 30

10

Asp Gly Tyr Thr Phe Leu Glu Trp Phe Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser

35 40 45

15

Pro Arg Arg Leu Ile Tyr Glu Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro

50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile

20 65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Ala

85 90 95

25

Thr His Asp Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105 110

30

Arg

35

<210> 53

<211> 113

<212> PRT

198
204

<213> Artificial

<220>

<223> VL h5F9.21

5

<400> 53

Asp Val Val Leu Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Leu Gly

1 5 10 15

10

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Glu Tyr Ser

20 25 30

15

Asp Gly Tyr Thr Phe Leu Glu Trp Phe Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser

35 40 45

20

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Glu Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro

50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile

25 65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Ala

85 90 95

30

Thr His Asp Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105 110

35

Arg

<210> 54
<211> 113
5 <212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> VL h5F9.22
10
<400> 54

Asp Val Val Leu Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Leu Gly
1 5 10 15
15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Glu Tyr Ser
20 25 30

20
Asp Gly Tyr Thr Phe Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

25 Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Glu Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
30 65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Ala
85 90 95
35

Thr His Asp Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

200
208

	100	105	110
5	Arg		
	<210> 55		
	<211> 121		
10	<212> PRT		
	<213> Artificial		
	<220>		
	<223> VH 8D1		
15	<400> 55		
	Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Thr		
	1 5 10 15		
20			
	Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr		
	20 25 30		
25			
	Val Met His Trp Val Lys Gln Lys Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile		
	35 40 45		
30			
	Gly Tyr Ile Ile Pro Tyr Asn Asp Asn Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe		
	50 55 60		
	Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ser Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr		
35	65 70 75 80		

20/
207

Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

5 Ala Arg Arg Asn Glu Tyr Tyr Gly Ser Ser Phe Phe Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
10 115 120

<210> 56
<211> 108
15 <212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> VL 8D1
20
<400> 56

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser Ala Ser Leu Glu
1 5 10 15
25

Glu Ile Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Asp Ile Asp Asn Tyr
20 25 30

30
Leu Ala Trp Tyr His Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

35 Tyr Gly Ala Thr Asn Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Arg Ser Gly Thr Gln Phe Ser Leu Lys Ile Asn Arg Leu Gln Ile
65 70 75 80

5
Glu Asp Leu Gly Ile Tyr Tyr Cys Leu Gln Gly Tyr Ile Pro Pro Arg
 85 90 95

10 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg
 100 105

 <210> 57
15 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Artificial

 <220>
20 <223> VH 5F9 CDR H1

 <400> 57

 Asn Tyr Gly Met Asn
25 1 5

 <210> 58
 <211> 17
30 <212> PRT
 <213> Artificial

 <220>
 <223> VH 5F9 CDR-H2

35 <400> 58

Met Ile Tyr Tyr Asp Ser Ser Glu Lys His Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

5 Gly

10 <210> 59
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Artificial

15 <220>
 <223> VH 5F9 CDR-H3

 <400> 59

20 Gly Thr Thr Pro Asp Tyr
 1 5

25 <210> 60
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial

30 <220>
 <223> VL 5F9 CDR-L1
 <400> 60

35 Arg Ser Ser Gln Ser Leu Glu Tyr Ser Asp Gly Tyr Thr Phe Leu Glu
 1 5 10 15

 <210> 61

204
210

<211> 7
 <212> PRT
 <213> Artificial

5 <220>
 <223> VL 5F9 CDR-L2
 <400> 61

10 Glu Val Ser Asn Arg Phe Ser
 1 5

<210> 62
 15 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 20 <223> VL 5F9 CDR-L3
 <400> 62

Phe Gln Ala Thr His Asp Pro Leu Thr
 25 1 5

<210> 63
 <211> 5
 30 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> VH 8D1 CDR-H1
 35 <400> 63

Ser Tyr Val Met His
1 5

5 <210> 64
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> VH 8D1 CDR-H2

 <400> 64

15 Tyr Ile Ile Pro Tyr Asn Asp Asn Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe Lys
 1 5 10 15

20 Gly

25 <210> 65
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Artificial

30 <220>
 <223> VH 8D1 CDR-H3

 <400> 65

35 Ala Arg Arg Asn Glu Tyr Tyr Gly Ser Ser Phe Phe Asp Tyr
 1 5 10

<210> 66

<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial

5 <220>
<223> VL 8D1 CDR-L1

<400> 66

10 Gln Ala Ser Gln Asp Ile Asp Asn Tyr Leu Ala
1 5 10

<210> 67
15 <211> 7
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
20 <223> VL 8D1 CDR-L2

<400> 67

Gly Ala Thr Asn Leu Ala Asp
25 1 5

<210> 68
<211> 9
30 <212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> VL 8D1 CDR-L3
35 <400> 68

Leu Gln Gly Tyr Ile Pro Pro Arg Thr

207
213

1

5

208
214

ANTICUERPOS MONOCLONALES CONTRA LA PROTEÍNA RGM A Y SUS USOS**RESUMEN**

Proteínas aisladas, particularmente anticuerpos monoclonales, que se unen y neutralizan la proteína RGM A. Específicamente, estos anticuerpos tienen la capacidad de

5 inhibir la unión de RGM A a su receptor y/o sus correceptores. Los anticuerpos de la invención, o sus porciones, son útiles para detectar RGM A e inhibir la actividad de RGM A, por ejemplo, en un ser humano afectado por un trastorno que incluye, no taxativamente, esclerosis múltiple, traumatismo cerebral en mamíferos, lesiones en la médula espinal, accidente cerebrovascular, enfermedades neurodegenerativas, y

10 esquizofrenia.

REIVINDICACIONES SOLICITUD DIVISIONAL

1. Una proteína de unión CARACTERIZADA PORQUE se disocia de RGM A humana (hRGM A) con una K_D de 1×10^{-7} M o menos, y una constante k_{off} de $1 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$ o menos, ambas determinadas por resonancia de plasmón superficial, donde la proteína de unión se selecciona de

- un anticuerpo monoclonal,
- un anticuerpo quimérico,
- un anticuerpo con un injerto de CDR,
- un anticuerpo humanizado,
- un Fab,
- un Fab',
- un F(ab')₂,
- un Fv,
- un Fv con enlaces disulfuro,
- un scFv,
- un anticuerpo de un solo dominio,
- un diacuerpo,
- un anticuerpo multiespecífico,
- un anticuerpo con especificidad doble,
- una inmunoglobulina con dos dominios variables, y
- un anticuerpo biespecífico.

2. Una proteína de unión CARACTERIZADA PORQUE se une a RGM A humana y neutraliza la actividad de inhibición del desarrollo de las neuritas de RGM A humana, lo cual puede determinarse con un ensayo in vitro convencional.

3. La proteína de unión de una de las reivindicaciones precedentes, CARACTERIZADA PORQUE tiene al menos una de las siguientes características funcionales adicionales:

- unión a RGM A de rata,
- unión a RGM C humana, y
- unión a RGM C de rata.

4. La proteína de unión de una de las reivindicaciones precedentes, CARACTERIZADA PORQUE dicha proteína de unión modula la capacidad de RGM A unirse a al menos uno de sus receptores.

5. La proteína de unión de la reivindicación 4, CARACTERIZADA PORQUE dicha proteína de unión interactúa con el dominio de unión al receptor de RGM A humana.

6. La proteína de unión de la reivindicación 4, CARACTERIZADA PORQUE dicha proteína de unión modula al menos una de las siguientes interacciones:

- unión de RGM humana A a BMP-4 humana,

unión de hRGM A a la neogenina humana,
unión de hRGM C a la neogenina humana,
unión de RGM A humana a BMP-2 humana.

7. Una proteína de unión de acuerdo con una de las reivindicaciones precedentes, CARACTERIZADA PORQUE es un anticuerpo humanizado

8. Una proteína de unión de acuerdo con una de las reivindicaciones precedentes, CARACTERIZADA PORQUE comprende un dominio de unión a antígeno, donde dicha proteína de unión es capaz de unirse a un epítopo de una molécula RGM, donde dicho dominio de unión a antígeno comprende al menos una CDR que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en

GTTPDY	(SEQ ID N° 59),
FQATHDPLT	(SEQ ID N° 62),
ARRNEYYGSSFFDY	(SEQ ID N° 65),
LQGYIPRT	(SEQ ID N° 68), y

secuencias de aminoácidos de CDR modificadas que tienen una identidad de secuencia de al menos 50% con una de dichas secuencias.

9. La proteína de unión de acuerdo con una de las reivindicaciones precedentes, CARACTERIZADA PORQUE comprende además al menos una CDR que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID N° 57, 58, 60, 61, 63, 64, 66, 67, y secuencias de aminoácidos de CDR modificadas que tienen una identidad de secuencia de al menos 50% con una de dichas secuencias.

10. La proteína de unión de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, CARACTERIZADA PORQUE dicha al menos una CDR comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en

SEQ ID N° 57	Residuos 31-35 de SEQ ID N° 34
SEQ ID N° 58	Residuos 50-66 de SEQ ID N° 34
SEQ ID N° 59	Residuos 99-104 de SEQ ID N° 34
SEQ ID N° 60	Residuos 24-39 de SEQ ID N° 10
SEQ ID N° 61	Residuos 55-61 de SEQ ID N° 10
SEQ ID N° 62	Residuos 94-102 de SEQ ID N° 10
SEQ ID N° 63	Residuos 31-35 de SEQ ID N° 55
SEQ ID N° 64	Residuos 50-66 de SEQ ID N° 55
SEQ ID N° 65	Residuos 97-110 de SEQ ID N° 55

211
217

SEQ ID N° 66	Residuos 24-34 de SEQ ID N° 56
SEQ ID N° 67	Residuos 50-56 de SEQ ID N° 56
SEQ ID N° 68	Residuos 89-97 de SEQ ID N° 56.

11. La proteína de unión de acuerdo con la reivindicación 10, CARACTERIZADA PORQUE comprende al menos 3 CDR que se seleccionan entre un conjunto de CDR de dominios variables que consiste en

Conjunto VH 5F9		
VH 5F9 CDR-H1	Residuos 31-35 de SEQ ID N° 34	SEQ ID N° 57
VH 5F9 CDR-H2	Residuos 50-66 de SEQ ID N° 34	SEQ ID N° 58
VH 5F9 CDR-H3	Residuos 99-104 de SEQ ID N° 34	SEQ ID N° 59
Conjunto VL 5F9		
VL 5F9 CDR-L1	Residuos 24-39 de SEQ ID N° 10	SEQ ID N° 60
VL 5F9 CDR-L2	Residuos 55-61 de SEQ ID N° 10	SEQ ID N° 61
VL 5F9 CDR-L3	Residuos 94-102 de SEQ ID N° 10	SEQ ID N° 62
Conjunto VH 8D1		
VH 8D1 CDR-H1	Residuos 31-35 de SEQ ID N° 55	SEQ ID N° 63
VH 8D1 CDR-H2	Residuos 50-66 de SEQ ID N° 55	SEQ ID N° 64
VH 8D1 CDR-H3	Residuos 97-110 de SEQ ID N° 55	SEQ ID N° 65
Conjunto VL 8D1		
VL 8D1 CDR-L1	Residuos 24-34 de SEQ ID N° 56	SEQ ID N° 66
VL 8D1 CDR-L2	Residuos 50-56 de SEQ ID N° 56	SEQ ID N° 67
VL 8D1 CDR-L3	Residuos 89-97 de SEQ ID N° 57	SEQ ID N° 68,

o un conjunto de dominios variables donde al menos una de dichas 3 CDR es una secuencia de aminoácidos de una CDR modificada que tiene una identidad de secuencia de al menos 50% con la secuencia progenitora.

12. La proteína de unión de acuerdo con la reivindicación 11, CARACTERIZADA PORQUE dichos al menos dos conjuntos de CDR de dominios variables se seleccionan del grupo que consiste en

- Conjunto VH 5F9 y Conjunto VL 5F9; y
- Conjunto VH 8D1 y Conjunto VL 8D1.

13. La proteína de unión de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, CARACTERIZADA PORQUE comprende además un marco aceptor humano donde dicho marco aceptor humano comprende al menos una secuencia de aminoácidos seleccionada

212
218

del grupo que consiste en SEQ ID N° 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32 y 33.

14. La proteína de unión de acuerdo con la reivindicación 13, CARACTERIZADA PORQUE comprende un conjunto de secuencias de marco seleccionado del grupo que consiste en los siguientes conjuntos:

Conjunto VH3-48 (SEQ ID N° 15, 16 y 17)

Conjunto VH3-33 (SEQ ID N° 21, 22 y 23)

Conjunto VH3-23 (SEQ ID N° 24, 25 y 26)

cada uno de los cuales está combinado con otra secuencia de marco seleccionada entre

JH3 (SEQ ID N° 18),

JH4 (SEQ ID N° 19),

JH6 (SEQ ID N° 20);

o

seleccionado del grupo que consiste en los siguientes conjuntos:

Conjunto A18: (SEQ ID N° 27, 28 y 29)

Conjunto A17: (SEQ ID N° 31, 32 y 33),

cada uno de los cuales está combinado con otra secuencia de marco seleccionada entre JK2 (SEQ ID N° 2).

15. La proteína de unión de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, CARACTERIZADA PORQUE comprende al menos un dominio variable de la cadena pesada seleccionado entre SEQ ID N° 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42 y 43, y/o al menos un dominio variable de la cadena liviana seleccionado entre SEQ ID N° 44, 45 y 46.

16. La proteína de unión de la reivindicación 15, CARACTERIZADA PORQUE dicha proteína de unión comprende dos dominios variables, donde dichos dos dominios variables tienen secuencias de aminoácidos que se seleccionan entre

SEQ ID N° 35 y 44, 36 y 44, 37 y 44, 38 y 44, 39 y 44, 40 y 44, 41 y 44, 42 y 44, 43 y 44;

SEQ ID N° 35 y 45, 36 y 45, 37 y 45, 38 y 45, 39 y 45, 40 y 45, 41 y 45, 42 y 45, 43 y 45;

SEQ ID N° 35 y 46, 36 y 46, 37 y 46, 38 y 46, 39 y 46, 40 y 46, 41 y 46, 42 y 46, 43 y 46.

17. La proteína de unión de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 13 a 16, CARACTERIZADA PORQUE dicho marco aceptor humano comprende al menos una sustitución de un residuo de aminoácido clave en dicha región del marco, donde dicho residuo clave se selecciona del grupo que consiste en

un residuo adyacente a una CDR;

un residuo de un sitio de glicosilación;
 un residuo raro;
 un residuo capaz de interactuar con un epítopo de RGM;
 un residuo capaz de interactuar con una CDR;
 un residuo canónico;
 un residuo de contacto entre la región variable de la cadena pesada y la región variable de la cadena liviana;
 un residuo en una zona Vernier;
 un residuo en el extremo N capaz de formar paraglutamato, y
 un residuo en una región de superposición entre una cadena pesada variable CDR1, tal como la define Chotia, y el primer marco de una cadena pesada, tal como la define Kabat.

18. La proteína de unión de acuerdo con la reivindicación 17, CARACTERIZADA PORQUE dicho residuo clave se selecciona del grupo que consiste en

(posición de la secuencia de la cadena pesada): 1, 5, 37, 48, 49, 88, 98;

(posición de la secuencia de la cadena liviana): 2, 4, 41, 51.

19. La proteína de unión de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, CARACTERIZADA PORQUE dicha proteína de unión comprende al menos un dominio variable (marco mutado) que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en

SEQ ID N° 47, 48, 49, 50;

SEQ ID N° 51, 52, 53 y 54.

20. La proteína de unión de la reivindicación 19, CARACTERIZADA PORQUE dicha proteína de unión comprende dos dominios variables, donde dichos dos dominios variables tienen secuencias de aminoácidos seleccionadas de los grupos que consisten en

SEQ ID N° 47 y 44, 47 y 45, 47 y 46, 47 y 51, 47 y 52, 47 y 53, 47 y 54;

SEQ ID N° 48 y 44, 48 y 45, 48 y 46, 48 y 51, 48 y 52, 48 y 53, 48 y 54;

SEQ ID N° 49 y 44, 49 y 45, 49 y 46, 49 y 51, 49 y 52, 49 y 53, 49 y 54;

SEQ ID N° 50 y 44, 50 y 45, 50 y 46, 50 y 51, 50 y 52, 50 y 53, 50 y 54.

21. La proteína de unión de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, CARACTERIZADA PORQUE es capaz de unirse a RGM A humana.

22. La proteína de unión de la reivindicación 21, CARACTERIZADA PORQUE tiene al menos una de las siguientes características funcionales adicionales:

- unión a RGM A de rata,
- unión a RGM C humana,
- unión a RGM C de rata.

23. La proteína de unión de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, CARACTERIZADA PORQUE la proteína de unión es capaz de modular una función biológica de moléculas RGM mediante la unión a al menos uno de sus receptores.

24. La proteína de unión de la reivindicación 23, CARACTERIZADA PORQUE dicha proteína de unión modula al menos una de las siguientes interacciones:

- unión de RGM humana A a BMP-4 humana,
- unión de hRGM A a la neogenina humana,
- unión de hRGM C a la neogenina humana,
- unión de RGM A humana a BMP-2 humana.

25. La proteína de unión de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, CARACTERIZADA PORQUE dicha proteína de unión es capaz de inhibir una actividad biológica de RGM.

26. Una construcción de anticuerpos CARACTERIZADA PORQUE comprende una proteína de unión descrita en cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde dicha construcción de anticuerpos comprende además un polipéptido conector o un dominio constante de inmunoglobulina y donde dicha proteína de unión se selecciona del grupo que consiste de:

- una molécula de inmunoglobulina,
- un anticuerpo monoclonal,
- un anticuerpo quimérico,
- un anticuerpo con un injerto de CDR,
- un anticuerpo humanizado,
- un Fab,
- un Fab',
- un F(ab')₂,
- un Fv,
- un Fv con enlaces disulfuro,
- un scFv,
- un anticuerpo de un solo dominio,
- un diacuerpo,
- un anticuerpo multiespecífico,

un anticuerpo con especificidad doble,
una inmunoglobulina con dos dominios variables, y
un anticuerpo biespecífico.

27. La construcción de anticuerpos de acuerdo con la reivindicación 26, CARACTERIZADA PORQUE dicha proteína de unión comprende un dominio constante de la cadena pesada de la inmunoglobulina seleccionado del grupo que consiste en

un dominio constante de la IgM humana,
un dominio constante de la IgG1 humana,
un dominio constante de la IgG2 humana,
un dominio constante de la IgG3 humana,
un dominio constante de la IgG4 humana,
un dominio constante de la IgGE humana,
un dominio constante de la IgGD humana,
un dominio constante de la IgGA1 humana,
un dominio constante de la IgGA2 humana,
un dominio constante de la IgGY humana, y
los dominios constantes mutados correspondientes.

28. La construcción de anticuerpos de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 26 a 27, CARACTERIZADA PORQUE comprende un dominio constante de inmunoglobulina que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID N° 11, 12, 13 y 14

29. Un conjugado de anticuerpos CARACTERIZADO PORQUE comprende una construcción de anticuerpos descrita en cualquiera de las reivindicaciones 26 a 27, donde dicho conjugado de anticuerpos comprende además un agente seleccionado del grupo que consiste en una molécula de inmunoadhesión, un agente para el diagnóstico por imágenes, un agente terapéutico y un agente citotóxico.

30. El conjugado de anticuerpos de acuerdo con la reivindicación 29, CARACTERIZADO PORQUE dicho agente es un agente para el diagnóstico por imágenes seleccionado del grupo que consiste en una radiomarca, una enzima, una marca fluorescente, una marca luminiscente, una marca bioluminiscente, una marca magnética, y biotina.

31. El conjugado de anticuerpos de acuerdo con la reivindicación 30, CARACTERIZADO PORQUE dicho agente es un agente terapéutico o citotóxico seleccionado del grupo que consiste en un antimetabolito, un agente alquilante, un antibiótico, un factor de crecimiento, una citoquina, un agente antiangiogénico, un agente antimitótico, una antraciclina, una toxina y un agente apoptótico.

32. Un ácido nucleico aislado CARACTERIZADO PORQUE codifica (i) una secuencia de aminoácidos de una proteína de unión de cualquiera de las reivindicaciones 1-25; (ii) una secuencia de aminoácidos de una construcción de anticuerpos de cualquiera de las reivindicaciones 26-28; o una secuencia de aminoácidos de un conjugado de anticuerpos de cualquiera de las reivindicaciones 29-31.

33. Un vector CARACTERIZADO PORQUE comprende un ácido nucleico aislado de acuerdo con la reivindicación 32.

34. El vector de la reivindicación 33, CARACTERIZADO PORQUE dicho vector se selecciona del grupo que consiste en pcDNA, pTT, pTT3, pEFBOS, pBV, pJV, pHibE y pBJ.

35. Una célula huésped CARACTERIZADA PORQUE comprende un vector de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 33 y 34 donde dicha célula huésped es una célula procariota, o dicha célula huésped es una célula eucariota genéticamente modificada.

36. La célula huésped de acuerdo con la reivindicación 35, CARACTERIZADA PORQUE dicha célula huésped es *E. coli*.

37. La célula huésped de acuerdo con la reivindicación 36, CARACTERIZADA PORQUE dicha célula genéticamente modificada se selecciona de Células HEK, Células CHO, Células COS y células de levadura.

38. Un método para producir una proteína capaz de unirse a RGM, CARACTERIZADO PORQUE comprende cultivar una célula huésped de cualquiera de las reivindicaciones 35 a 37 en un medio de cultivo, bajo condiciones apropiadas para producir una proteína de unión capaz de unirse a RGM.

39. Una proteína CARACTERIZADA PORQUE ha sido producida de acuerdo con el método de la reivindicación 38.

40. Una composición farmacéutica CARACTERIZADA PORQUE comprende el producto de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 31 y un vehículo aceptable para el uso farmacéutico.

41. La composición farmacéutica de la reivindicación 40, CARACTERIZADA PORQUE dicho vehículo aceptable para el uso farmacéutico funciona como un coadyuvante útil para incrementar la absorción o la dispersión de dicha proteína de unión.

42. La composición farmacéutica de la reivindicación 41, CARACTERIZADA PORQUE comprende además al menos un agente terapéutico adicional para tratar un trastorno donde la actividad de RGM es perjudicial.

43. La composición farmacéutica de la reivindicación 42, CARACTERIZADA PORQUE dicho agente terapéutico adicional se selecciona del grupo que consiste en un agente terapéutico, un agente para el diagnóstico por imágenes, un agente citotóxico, un inhibidor de la angiogénesis, un inhibidor de quinasa, un bloqueador de una molécula de co-estimulación, un bloqueador de una molécula de adhesión, un anticuerpo anti-citoquina o un fragmento funcional de éste, metotrexato, ciclosporina, rapamicina, FK506, una marca o una señal detectable, un antagonista del TNF, un antirreumático, un relajante muscular, un narcótico, una droga antiinflamatoria no esteroidea (NSAID), un analgésico, un anestésico, un sedante, un anestésico local, un bloqueador neuromuscular, un agente antimicrobiano, un antipsoriático, un corticosteroide, un anabólico esteroideo, una eritropoyetina, un agente de inmunización, una inmunoglobulina, un inmunosupresor, una hormona de crecimiento, una droga para el reemplazo de una hormona, un radiofármaco, un antidepresivo, un antipsicótico, un estimulante, un medicamento para el asma, un agonista beta, un esteroide inhalable, una epinefrina o un análogo, una citoquina, y un antagonista de citoquina.

44. Una composición farmacéutica CARACTERIZADA PORQUE comprende el producto de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 31 para uso en (i) reducir la actividad de RGM A humana; (ii) disminuir la unión de hRGM A a su receptor, la neogenina, en un sujeto que lo necesita; o (iii) disminuir la unión de hRGM A a la proteína morfogenética ósea 2 y/o la proteína morfogenética ósea 4 (BMP-2 y BMP-4) en un sujeto afectado por un trastorno donde la actividad de RGM A es perjudicial.

45. Una composición farmacéutica CARACTERIZADA PORQUE comprende el producto de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 31 solo o en combinación con otros agentes terapéuticos para su uso en (i) el tratamiento de un sujeto afectado por un trastorno asociado con la actividad de RGM A; o (ii) la reducción de la actividad de RGM A en un sujeto que sufre de un trastorno en el cual la actividad de RGM A es perjudicial.

46. La composición farmacéutica de la reivindicación 45, CARACTERIZADA PORQUE el trastorno comprende enfermedades neurológicas seleccionadas del grupo que comprende la esclerosis lateral amiotrófica, la lesión del plexo braquial, la lesión cerebral, incluyendo

la lesión cerebral traumática, la parálisis cerebral, el síndrome de Guillain Barre, la leucodistrofia, la esclerosis múltiple, el síndrome posterior a la poliomielitis, la espina bífida, las lesiones en la médula espinal, la atrofia muscular espinal, los tumores espinales, el accidente cerebrovascular, la mielitis transversal, la demencia, la demencia senil, la alteración cognitiva leve, la demencia relacionada con la enfermedad de Alzheimer, la corea de Huntington, la disquinesia tardía, la hiperquinesia, la manía, el morbo de Parkinson, el síndrome de Steel-Richard, el síndrome de Down, la miastenia grave, el traumatismo nervioso, la amiloidosis vascular, la hemorragia cerebral con amiloidosis, la inflamación cerebral, el trastorno de confusión aguda, la esclerosis lateral amiotrófica, el glaucoma y la enfermedad de Alzheimer.

CASTELLANOS & Co. LTDA
ABOGADOS
Calle 94 A No. 7 A - 09
Bogotá, D.C., COLOMBIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 10-117825-00006-0000

Fecha 2012-03-05 15:13:55 Dep. 2020 DIR NUEVASCR
Tra 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act 449 RESPUESOPOSICI Folios 225

Señor

Director de la División de Nuevas Creaciones

Superintendencia de Industria y Comercio

Ministerio de Comercio, Desarrollo Industria y Turismo

E. S. D.

Ref.: Expediente No. 10.117.825

Solicitud de Patente PCT entrada Fase Nacional para: **"PROTEINAS DE UNION A LA PROTEINA RGM A, SUS CONSTRUCCIONES Y CONJUGADOS DE ANTICUERPOS MONOCLONALES CONTRA LA PROTEINA RGM A"**

Solicitante: **ABBOTT GMBH & CO. KG. y ABBOTT LABORATORIES**

RESPUESTA A OPOSICIÓN

MARGARITA CASTELLANOS ABONDANO, mayor de edad, identificada y domiciliada como aparece al pie de mi firma, atentamente me permito presentar respuesta al oficio No. 19389 notificado por fijación en lista el 15 de diciembre de 2011 correspondiente a la oposición presentada por **PROCAPS S.A.**, en los siguientes términos:

El solicitante manifiesta a este Despacho que la oposición presentada por **PROCAPS S.A.** debe declararse infundada por las siguientes razones:

Argumentos del Opositor

El opositor advierte en primer lugar que algunas reivindicaciones de la presente solicitud se refieren al uso y a un método de tratamiento, correspondientes a materia no patentable de conformidad con el Artículo 20 de la Decisión 486. Adicionalmente,

220
225

concluye que dichas reivindicaciones no cumplen con el requisito de aplicación industrial.

En contra del nivel inventivo de ésta solicitud, el opositor cita el documento D1: *Katsuhiko hata y otros, "RGMA inhibition promotes axonal growth and recovery after spinal cord injury". The Journal of Cell Biology 10 APR 2006, vol. 173, no. 1, 10 April 2006 (2006-04-10), páginas 47-58, XP002529131. ISSN: 0021-9525*, y concluye que a partir de esta divulgación y los conocimientos del experto en la materia técnica, éste derivaría evidentemente anticuerpos que tienen la capacidad de inhibir la unión de RGM A a su receptor y/o sus receptores.

Argumentos del solicitante

El solicitante presenta los siguientes argumentos a favor de la patentabilidad de la solicitud y que desacreditan la posición de **PROCAPS S.A.**:

Nuevas reivindicaciones para el examen de patentabilidad:

El solicitante presenta un nuevo pliego reivindicatorio dirigido a anticuerpos monoclonales aislados que tienen dos conjuntos de CDR de dominios variables que se seleccionan de un grupo que consiste de: Conjunto VH 5F9 y Conjunto VL 5F9; y Conjunto VH 8D1 y Conjunto VL 8D1. Las reivindicaciones relativas a métodos de tratamiento se han eliminado.

Altura inventiva de la solicitud:

El oponente argumenta que las reivindicaciones carecen de actividad inventiva en vista de Hata et al, Journal of Cell Biology , Apr 10 2006, Vol. 173(1):47-58 (2006). El Solicitante respetuosamente disiente con esta afirmación toda vez que no hay elementos en Hata et al, que revelen o sugieran los anticuerpos aislados que tienen los conjuntos de CDR de dominios variables como se reivindican en las reivindicaciones que se acompañan. Específicamente Hata et al, no revela o sugiere los anticuerpos

5F9 y 8D1, y por lo tanto, a partir de dicha divulgación, la persona medianamente versada en la materia no podría llegar a la materia reivindicada por el solicitante.

Manifiesto que la posición del opositor en contra del nivel inventivo de ésta solicitud no esta fundamentada toda vez que en su análisis no considera las diferencias existentes entre las invenciones ni los efectos técnicos derivados de dichas diferencias. Adicionalmente, no prueba cómo a partir de los conocimientos del técnico medio se podría modificar la propuesta de D1 de tal forma que se llegue al objeto reivindicado en esta solicitud.

En vista de la anterior aclaración en cuanto a las diferencias que presenta ésta invención con respecto a D1, respetuosamente solicito a su Despacho declarar infundada la oposición de **PROCAPS S.A.** y continuar con el examen de patentabilidad de la invención de conformidad con la legislación vigente para que el solicitante pueda ampliar los argumentos y proporcionar evidencias a favor de los requisitos de patentabilidad cuando les sean pertinentemente requeridos.

Por otra parte, presento junto con este memorial una solicitud divisional y solicito se tengan como presentados los documentos de poder otorgados por las sociedades **ABBOTT GMBH & CO. KG.** y **ABBOTT LABORATORIES** que reposan en el expediente No. **10.117.825.**

Anexos

- Formulario de modificaciones
- Recibo de pago correspondiente a tasa por modificación voluntaria
- Recibo de pago correspondiente a tasa por reivindicación adicional a la número 10.
(1 reivindicación)
- Formato de división de solicitud

222
227

- Descripción y reivindicaciones de la Solicitud divisional
- Recibo de pago correspondiente a tasa por presentación de nueva solicitud
- Recibo de pago correspondiente a tasa por reivindicaciones adicionales a la número 10. (36 reivindicaciones)

Del Señor Director,



Margarita Castellanos Abondano

C.C. No. 39.779.654 de Usaquén

T.P.A. No. 70.819 de C.S.J.

Calle 94 A No. 7 A-09 – Bogotá, D.C.

Tel.: 7560770

01

2012

Bogotá, D.C.

Memorial respuesta a oposición PROCAPS S.A./ P1998